



Année 2013

Thèse n°2105

THÈSE

pour le

Doctorat des Universités Bordeaux 1 et Bordeaux Segalen Mention Sciences, Technologies, Santé

Spécialité : **Biologie Végétale**

Présentée et soutenue publiquement

Le 16 décembre 2013

Par **Claireline MARAIS**

Née le 5 Juin 1986 à Soyaux (Charente, 16)

Rôle de la SNARE Memb11 comme « récepteur » de la GTPase Arf1 à l'appareil de Golgi chez *Arabidopsis thaliana*

Membres du Jury

M ^{me} Marylin Vantard	Directrice de Recherches CNRS	Présidente
M ^{me} Nathalie Leborgne-Castel	Professeur Université de Bourgogne	Rapporteur
M ^{me} Nadine Paris	Chargée de recherches CNRS	Rapporteur
M François Doignon	Professeur Université Bordeaux Segalen	Examineur
M Patrick Moreau	Directeur de Recherches CNRS	Directeur de Thèse

À ma famille

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier M^{me} Marilyn Vantard, M^{me} Nathalie Leborgne-Castel, M^{me} Nadine Paris et M. François Doignon d'avoir accepté d'analyser mon travail de Thèse.

Ces remerciements sont bien évidemment aussi adressés à M. René Lessire pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Biogenèse Membranaire (LBM) lors de mon stage de Master 2 et de mes trois années de Doctorat.

J'exprime toute ma gratitude à Lilly Maneta-Peyret et tout particulièrement à Patrick Moreau pour m'avoir donné l'opportunité de faire une thèse, de m'avoir encadrée tout au long de cette expérience. Je les remercie de leur gentillesse, de leur patience et de leur optimisme presque sans faille.

Je remercie aussi les autres membres de l'équipe pour leur gentillesse et leur soutien, Valérie pour m'avoir initiée aux mystères de la biologie moléculaire, Guillaume pour les joies des clonages multiples et Yohann pour nos discussions enrichissantes.

Je tiens à remercier tous les membres du LBM qui ont croisé ma route, ainsi que Marie-France Giraud, Jean-William Dupuy, Patricia Thebault, Frédéric Delmas et les filles du PIV pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apportée.

Je remercie également le Ministère de la Recherche pour la Bourse de Thèse qui m'a permis de réaliser ce travail.

Merci aux filles, Houda et Camille pour leur gentillesse, pour les nombreux fous rires partagés et pour m'avoir supportée pendant ces derniers mois. Je remercie aussi toutes les personnes ayant « résidé » dans le bureau des étudiants dont Artemis, Amélie et Rémi pour leur bonne humeur et les moments passés ensemble. Tous mes remerciements reviennent aussi à mes amis (Maud, Jean-Baptiste, ...).

Je ne remercierai jamais assez mes parents, mon frère, Caroline et Dorian ainsi que toute ma famille pour leur amour, leur soutien et leur compréhension. Je remercie de tout mon cœur Jérémy pour m'avoir suivi et « supporté » pendant ces huit années de vie étudiante. Sans eux je ne serais pas ce que je suis aujourd'hui.

TABLE DES MATIERES

Contenu

I	INTRODUCTION	- 1 -
I.1	Généralités sur les cellules procaryotes et eucaryotes	- 3 -
I.2	Présentation de la Voie Sécrétoire	- 5 -
I.3	Interface RE-Golgi	- 11 -
I.3.A	Introduction : Description de l'interface RE-Golgi	- 11 -
I.3.B	Bourgeonnement des vésicules de transport	- 15 -
I.3.C	Ciblage des vésicules et Fusion des membranes	- 25 -
I.3.D	En résumé	- 35 -
I.4	Présentation du sujet de thèse.	- 35 -
II	RESULTATS	- 38 -
II.1	Etude de la famille des Membrines, obtention et caractérisation d'un anticorps et recherche de partenaires	- 40 -
II.1.A	Présentation de la famille des Membrines dans différentes espèces végétales	- 40 -
II.1.B	Obtention et caractérisation d'un anticorps anti-Memb11	- 42 -
II.2	Recherche de partenaires de Memb11 et Memb12 par immunoprécipitation	- 48 -
II.3	Mise en évidence <i>in vivo</i> par approche BiFC de l'interaction Memb11/Memb12-Arf1 ...	- 52 -
II.4	Etude de la structure des protéines Memb11 et Memb12 par bio-informatique	- 56 -
II.4.A	Détermination de la structure secondaire	- 56 -
II.4.B	Détermination de la structure tridimensionnelle	- 60 -
II.4.C	Observation des structures et comparaisons	- 72 -
II.5	Résultats préliminaires sur la caractérisation de l'interaction Memb11-Arf1	- 76 -
II.5.A	« Design » de mutants	- 76 -
II.5.B	Etude des interactions par BiFC sur racines d' <i>A. thaliana</i>	- 78 -
II.5.C	Etude de l'interaction par BiFC sur cotylédons d' <i>A. thaliana</i>	- 78 -
III	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	- 82 -
III.1	Discussion et perspectives à court terme (article en préparation)	- 84 -
III.2	Discussion et perspectives à plus long terme	- 88 -
IV	MATERIEL ET METHODES	- 98 -
IV.1	Matériel biologique	- 100 -
IV.1.A	Matériel végétal et conditions de culture	- 100 -

IV.1.B	Souches bactériennes et milieux de culture.	- 101 -
IV.2	Méthodes de biologie moléculaire.....	- 102 -
IV.2.A	Extraction des acides nucléiques.....	- 102 -
IV.2.B	Amplification d'acides nucléiques par PCR (Polymerase Chain Reaction)	- 104 -
IV.2.C	Electrophorèse des acides nucléiques	- 104 -
IV.2.D	Purification d'un fragment de PCR.....	- 105 -
IV.2.E	Clonages	- 105 -
IV.2.F	Création des micro-ARN artificiels (amiRNAs).....	- 108 -
IV.2.G	Obtention des mutants Memb11 et Memb12.....	- 109 -
IV.3	Expression <i>in-vitro</i>	- 110 -
IV.4	Transformation du matériel vivant	- 113 -
IV.4.A	Préparation de bactéries pour transformation par électroporation.....	- 113 -
IV.4.B	Stockage et conservation des souches de bactéries	- 113 -
IV.4.C	Méthode de transformation d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	- 114 -
IV.5	Méthode d'analyse des protéines.....	- 115 -
IV.5.A	Purification d'anticorps polyclonaux.....	- 115 -
IV.5.B	Test ELISA par compétition.....	- 115 -
IV.5.C	Extraction des protéines.....	- 116 -
IV.5.D	Quantification.....	- 117 -
IV.5.E	Electrophorèse en conditions dénaturantes : SDS-PAGE.....	- 117 -
IV.5.F	Analyse par spectrométrie de masse	- 118 -
IV.5.G	Western Blot.....	- 118 -
IV.6	Méthodes d'analyse des interactions protéiques.....	- 120 -
IV.6.A	Immunoprécipitation.....	- 120 -
IV.6.B	Immunoprécipitation sur les peptides synthétisés <i>in vitro</i>	- 120 -
IV.6.C	Le BiFC : Bimolecular Fluorescence Complementation.....	- 121 -
IV.7	Observation	- 123 -
IV.7.A	Microscopie confocale.....	- 123 -
IV.7.B	Microscopie électronique à transmission (MET).....	- 123 -
IV.8	Etude Bio-informatique.....	- 125 -
V	BIBLIOGRAPHIE.....	- 132 -

Liste des abréviations

Arf1 :	ADP-Ribosylation Factor 1
BiFC :	BIomolecular Fluorescence Complementation
BSA :	Bovine Serum Albumin
COPI :	COat Protein I
COPII :	COat Protein II
EDTA :	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
ELISA :	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ER :	Endoplasmic Reticulum
ERES :	ER Exit Sites
ERIS :	ER Import Sites
ERGIC :	ER-Golgi Intermediate Compartment
GAP :	GTPases-Activating Proteins
GEF :	Guanine nucleotide Exchange Factor
GFP :	Green Fluorescent Protein
HEPES :	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
MET :	Microscope Electronique à Transmission
mRFP :	monomeric Red Fluorescent Protein
NSF :	N-ethylmaleimide Sensitive Factor
PBS :	phosphate buffered saline
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PDB :	Protein Data Bank
RE :	Réticulum Endoplasmique
Sar1 :	Secretion Associated RAS-related 1
SDS :	Sodium DodecylSulfate
SNAP :	Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment Protein
SNARE :	Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptor
TGN :	<i>trans</i> -Golgi network
UPR :	Unfolded Protein Response
UTR :	UnTranslated Region
YFP :	Yellow Fluorescent Protein

I INTRODUCTION

I.1 Généralités sur les cellules procaryotes et eucaryotes

Lors de l'évolution du vivant, le passage des cellules procaryotes à eucaryotes a été une étape déterminante. La différence majeure entre ces deux types cellulaires se trouve au niveau du noyau. Effectivement comme leur nom l'indique les cellules procaryotes (du grec *pro*, « avant » et *karuon*, « noyau ») ne possèdent pas de noyau et le matériel génétique est concentré dans une région appelée nucléoïde. Dans le cas des cellules eucaryotes (du grec *eu*, « vrai », et *karuon*, « noyau »), il existe un noyau délimité par une membrane nucléaire renfermant le matériel génétique. Une autre différence importante réside dans la présence d'endomembranes dans les cellules eucaryotes. Elles permettent de compartimenter les fonctions de la cellule au sein de différents organites comme le Réticulum Endoplasmique (RE), l'appareil de Golgi, les lysosomes, les endosomes, les vacuoles, les mitochondries, les plastes... Cette compartimentation forme des microenvironnements favorables (par exemple le pH) à l'action ou à l'efficacité de différentes enzymes. Cela permet aussi de rassembler les processus complémentaires et de séparer ceux qui seraient incompatibles, par exemple la synthèse des protéines dans le RE et leur dégradation dans le lysosome (cellule animale) ou la vacuole (cellule végétale).

Selon la théorie endosymbiotique énoncée par Lynn Margulis (Sagan, 1967), certains organites des cellules eucaryotes proviennent de l'association de plusieurs procaryotes. Ainsi les mitochondries et les chloroplastes résulteraient respectivement de l'endocytose de bactéries aérobies et de cyanobactéries. Cette théorie est appuyée par différents critères :

- les mitochondries et les plastes possèdent leur propre matériel génétique et les machineries nécessaires à la synthèse des protéines.
- ces deux organites possèdent deux membranes, la membrane interne provenant de la bactérie et la membrane externe de la cellule eucaryote (fruit de l'endocytose originelle).
- la taille des mitochondries (environ $3\mu\text{m}$) et des plastes (environ $5\mu\text{m}$) est semblable à la taille des cellules procaryotes (entre $0,5$ et $10\mu\text{m}$)...

Les cellules eucaryotes sont donc plus grosses (généralement de 10 à $100\mu\text{m}$) que les cellules procaryotes.

Un des défis de la cellule eucaryote est d'assumer la communication entre les différents compartiments et donc le transfert des protéines et des lipides vers le bon compartiment subcellulaire. Les informations nécessaires à l'adressage sont souvent comprises dans la séquence de la protéine et environ un tiers des protéines sont dirigées vers la voie sécrétoire qui va gérer les

différentes protéines devant être retenues dans le système endomembranaire interne ou aller dans le milieu extracellulaire (Ghaemmaghami et al., 2003).

I.2 Présentation de la Voie Sécrétoire

Dans les années 1960, George Palade découvrit, en utilisant la microscopie électronique, que des protéines pouvaient être transportées entre des compartiments membranaires de cellules pancréatiques. Il décrit alors un transport de protéines à travers le RE et l'appareil de Golgi pour arriver dans les vésicules de sécrétion, les lysosomes ou la membrane plasmique. Ce fut le premier à décrire la voie sécrétoire (Farquhar and Palade, 1998) et il a été récompensé par le prix Nobel de Physiologie et Médecine en 1974 pour ses recherches.

La voie sécrétoire eucaryote est le siège de nombreux échanges et est responsable de la biogenèse et du transport des protéines, des sucres et des lipides entre les différents organites. Le trafic y est très dynamique et permet d'acheminer les différents composés vers la membrane plasmique et le milieu extracellulaire ou bien vers le système endomembranaire (organites). Non seulement la cellule peut alors répondre à ses besoins biologiques mais aussi grandir en sécrétant les lipides et les protéines néo synthétisés, nécessaires à la croissance des membranes.

La voie sécrétoire classique est composée du RE, de l'appareil de Golgi, du *trans*-Golgi network (TGN) et enfin du lieu de destination : milieu extracellulaire, membrane plasmique ou tout autre organite : RE, Golgi, lysosome, vacuole des cellules végétales, ... Il existe cependant d'autres voies non-conventionnelles qui, par exemple, ne passent pas par l'appareil de Golgi ou sont indépendantes de la machinerie COPII (Drakakaki and Dandekar, 2013).

Le RE est un réseau membranaire formant des citernes et des tubules. C'est le lieu de production de certaines protéines, des lipides et des sucres. Les protéines possédant un peptide signal particulier (séquence linéaire hydrophobe N-terminale ou peptide signal) sont adressées à la voie sécrétoire et donc au RE. L'hypothèse d'un tel signal a été énoncée la première fois par Günter Blobel en 1971 (Sabatini et al., 1971) qui s'interrogeait sur la façon dont les protéines sécrétées étaient d'abord dirigées vers le RE. Il a ensuite montré que les protéines possédaient un signal intrinsèque qui leur permettait d'être transloquées dans la membrane du RE et de la traverser. G. Blobel a été récompensé par le prix Nobel de Physiologie et Médecine en 1999 pour ces travaux.

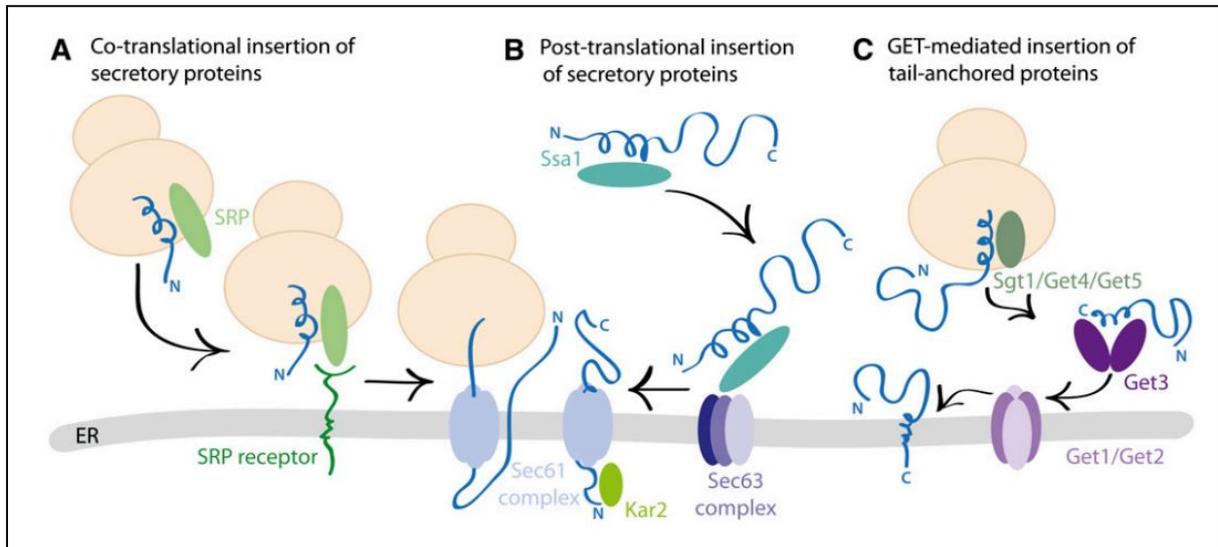


Figure I-1 : Translocation des protéines sécrétées dans la membrane du RE. (A) La particule SRP reconnaît un signal hydrophobe ou un domaine transmembranaire d'un peptide puis le ribosome synthétisant le peptide est adressé à la membrane par le récepteur de SRP ce qui provoque la synthèse du peptide à travers la membrane. (B) Lors de la translocation post-traductionnelle, l'ATPase cytosolique Hsp70 (Ssa1 chez la levure) maintient la protéine dans un état non-replié et la livre au complexe membranaire Sec63. La protéine est ensuite acheminée au canal de translocation Sec61 afin de traverser la membrane. Sec61 est aussi utilisé dans le cadre de la translocation co-traductionnelle. L'ATPase Hsp70 luménale, Kar2, prend en charge le brin traversant la membrane et dirige le mouvement de la protéine ainsi que sont repliement. (C) Lors de l'insertion du domaine N-terminal transmembranaire, les protéines Get prennent en charge la protéine à différentes étapes afin de la transloquer. Cette voie est indépendante du canal de translocation Sec61. (Barlowe and Miller, 2013)

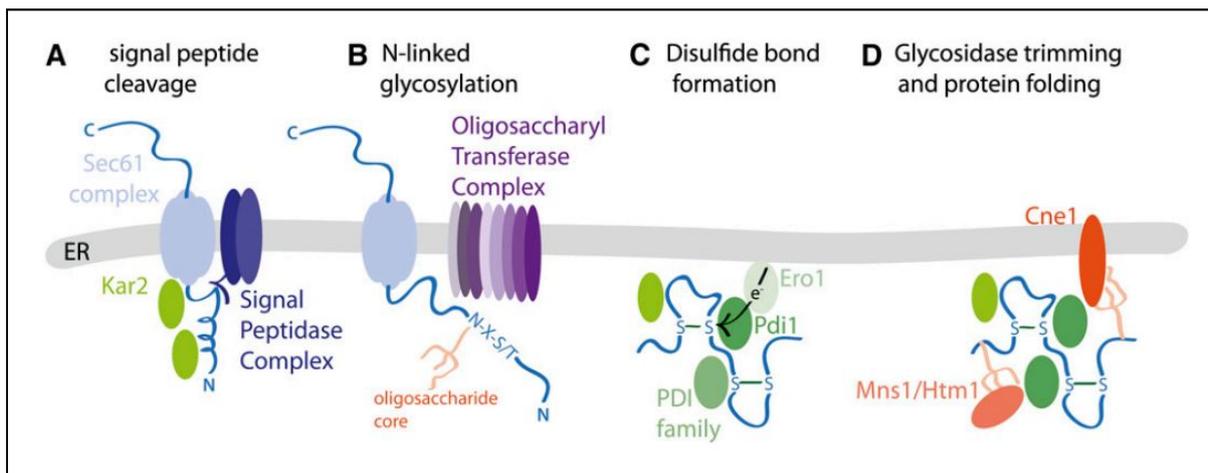


Figure I-2 : Repliement et maturation des protéines sécrétées. Une série de modifications covalentes accompagnent la biogenèse des protéines dans le RE. (A) Le « Signal Peptidase Complex » clive la séquence signal hydrophobe pendant la translocation du peptide. (B) En même temps, un corps d'oligosaccharide est attaché à la séquence consensus N-X-S/T en N-terminal du peptide. (C) Dans le lumen du RE, l'environnement oxydatif permet la formation réversible de ponts disulfures par les protéines disulfure isomérases. (D) Rognage des résidus glucose et mannose du corps d'oligosaccharide et vérification de la qualité et du repliement de la protéine. (Barlowe and Miller, 2013)

Plusieurs voies permettent la translocation des protéines et leur synthèse au sein du RE (Barlowe and Miller, 2013) (Fig. I-1) mais la principale est celle utilisant le peptide signal.

Lorsqu'une protéine possède un peptide signal, celui-ci est reconnu par la « particule de reconnaissance du signal » (SRP) qui est composée de 6 protéines, d'un ARN et de GTP. Le complexe ainsi formé est recruté à la membrane du RE par le récepteur membranaire de SRP qui est lui-même lié au canal de translocation formé par le complexe Sec61. Le ribosome est alors collé à la membrane et continue à synthétiser la protéine dans le RE. De manière surprenante, il a été montré que des levures ne possédant plus les composants de SRP ont une croissance ralentie mais restent viables. Les protéines peuvent donc utiliser une autre machinerie cytosolique pour être acheminées vers le canal de translocation.

C'est le cas de la translocation post traductionnelle. Les chaperonnes cytosoliques de type Hsp70 (Ssa1 chez *S. cerevisiae*) se fixent à la partie hydrophobe de la protéine et la maintiennent dans un état non replié compatible avec la translocation. Les chaperonnes vont ensuite livrer la protéine au complexe membranaire Sec63 et la chaperonne présente dans la lumière du RE, Kar2 (une Hsp70) aidera la protéine pour la translocation puis pour son repliement.

Cependant il est clair que certaines protéines (les protéines membranaires intégrales et celles possédant un peptide signal fortement hydrophobe) préfèrent la translocation co-traductionnelle alors que d'autres (protéines solubles et celles dont le peptide signal est peu hydrophobe) tolèrent très bien la voie post-traductionnelle (Barlowe and Miller, 2013).

Une troisième voie, récemment identifiée, permet l'intégration à la membrane du RE, de petites protéines membranaires intégrales et de protéines ancrées par l'extrémité C-terminale. C'est la voie guidée par les protéines Get (Barlowe and Miller, 2013; Stefanovic and Hegde, 2007). Le domaine transmembranaire est ici caché par le ribosome, empêchant l'interaction du complexe SRP. La protéine est alors prise en charge par différentes protéines Get et Sgt qui lui permettront de s'insérer dans la membrane. Cette voie est indépendante du complexe Sec61 mais le mécanisme d'ancrage reste à être défini.

Une fois dans la lumière du RE les protéines vont subir de nombreuses modifications (Fig. I-2) comme les N-glycosylations, la formation des ponts disulfures, le repliement des protéines et la modification des oligosaccharides mais aussi l'ajout d'ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) qui permet l'ancrage de protéines solubles aux membranes. Toutes

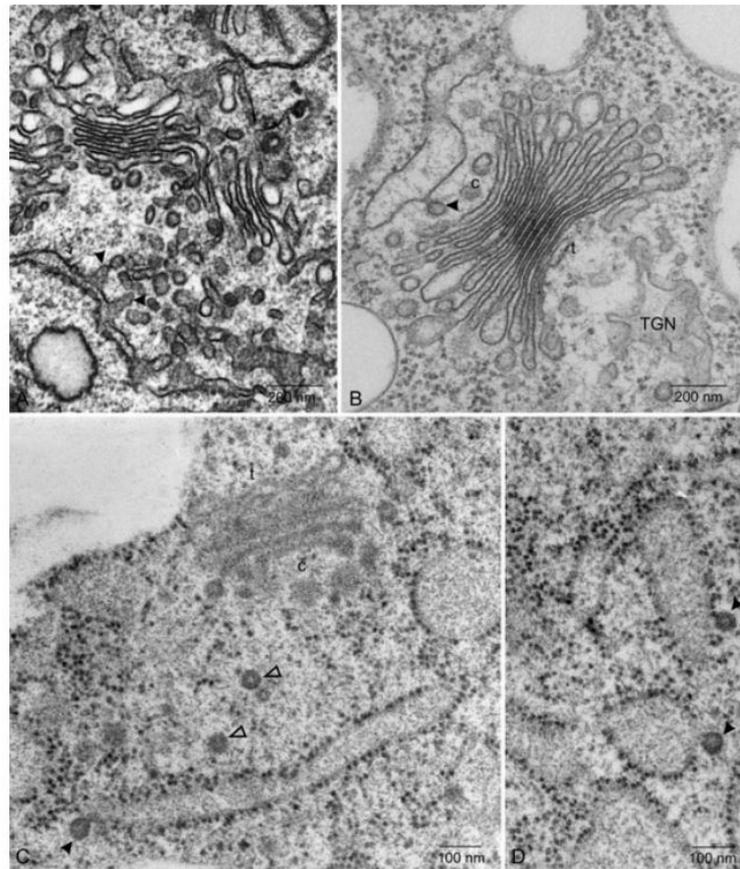


Figure I-3 : Micrographies de vésicules COPII dans différentes cellules eucaryotes. (A) Cellule HeLa, (B) *Chlamydomonas noctigama* et (C, D) endospermes d'*Arabidopsis thaliana*. Les bourgeons de vésicules COPII sont indiqués par des têtes de flèches pleines et les vésicules putatives libres COPII sont indiquées par des têtes de flèches vides. (Langhans et al., 2012)

ces modifications sont contrôlées par un programme de reconnaissance de transcription appelé UPR (Unfolded Protein Response). Le système UPR est activé lorsqu'un niveau élevé de protéines non-repliées est détecté et permet aux protéines d'être reprises en charge par les différentes enzymes nécessaires à leur maturation. Si les protéines ne sont toujours pas dans la bonne conformation elles seront expulsées du RE puis ubiquitinylées afin d'être dégradées.

Les molécules cargos sont ensuite acheminées vers l'appareil de Golgi où les protéines subiront de nouvelles modifications post traductionnelles. Le transport entre le RE et l'appareil de Golgi est bidirectionnel et se fait par voie vésiculaire. Le transport antérograde va du RE vers l'appareil de Golgi avec la machinerie COPII (COat ProteinII) (exemples de vésicules COPII dans la Fig. I-3) alors que le transport rétrograde qui ramène les protéines résidentes du RE est pris en charge par la machinerie COPI (Letourneur et al., 1994; Spang and Schekman, 1998). Ces transports se déroulent en trois étapes (Fig. I-4) : la création des vésicules avec l'adressage des molécules cargos et le bourgeonnement de la membrane, l'adressage des vésicules puis leur ancrage à la membrane cible et la fusion des membranes afin de libérer le contenu de la vésicule dans le compartiment accepteur. Toutes ces étapes sont complexes et seront étudiées en détail dans les chapitres suivants.

L'appareil de Golgi est composé d'un empilement de saccules aussi appelé dictyosome. Chaque saccule possède une fonction différente et renferme des enzymes particulières. Les protéines cheminant par la voie sécrétoire entrent dans l'appareil de Golgi par la face *cis* et traversent les saccules jusqu'à la face *trans*. Le mécanisme permettant la transition entre les différents saccules n'a toujours pas été clairement déterminé. D'après le modèle vésiculaire, les saccules de l'appareil de Golgi sont statiques et le transport antérograde des molécules cargo se fait par des vésicules COPI. Le modèle de maturation et de progression propose quant à lui, que les vésicules COPII provenant du RE s'agrègent au niveau *cis*-golgien pour former le premier compartiment, qu'il y a ensuite maturation du compartiment qui évoluerait en structure médiane et enfin *trans*. Les protéines résidentes de l'appareil de Golgi seraient recyclées de façon rétrograde au sein de vésicules COPI afin de toujours être localisées dans les mêmes citernes du dictyosome. Et pour finir, un modèle hybride entre les deux, le « percolating model » où les vésicules COPI permettraient à la fois un transport intra-golgien antérograde et rétrograde en même temps que la maturation des saccules (Orci et al., 2000). Les vésicules COPI intra-golgiennes sont facilement observables par microscopie électronique à transmission tout autour de l'appareil de Golgi (Fig. I-5).

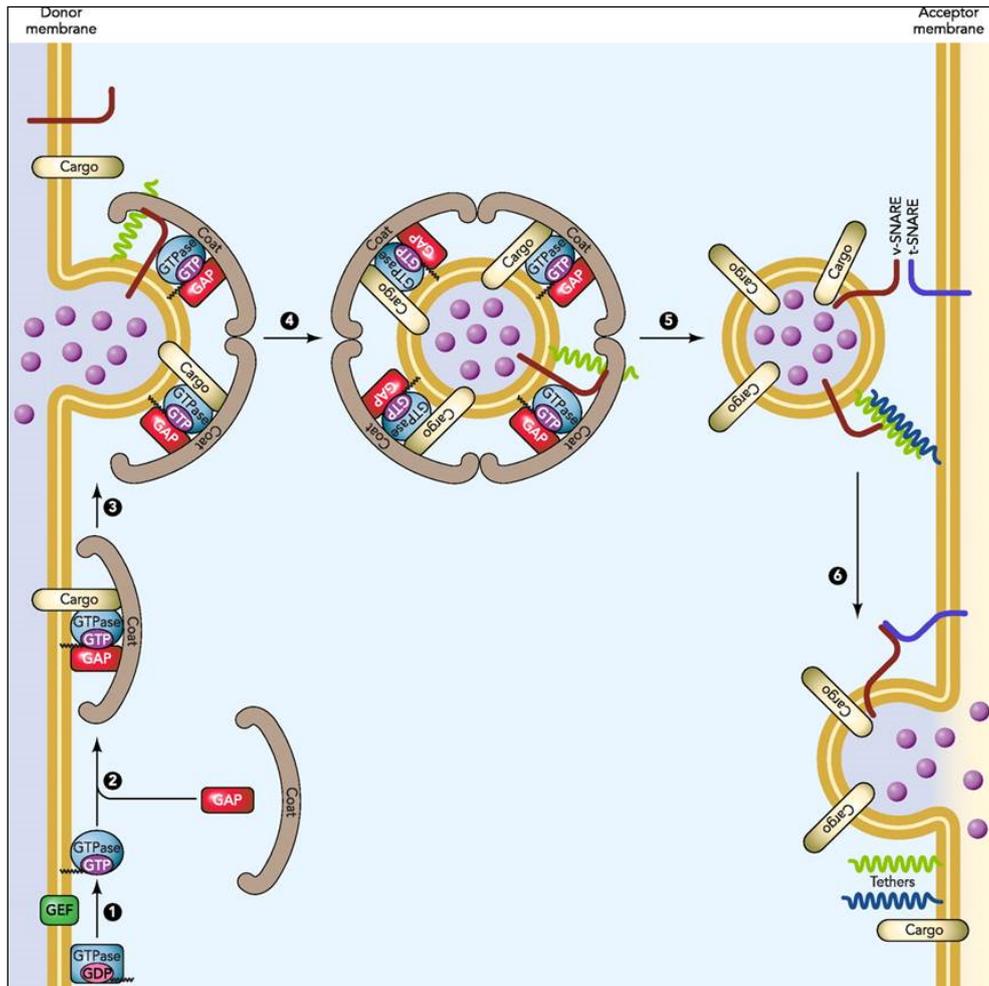


Figure I-4 : Les étapes du transport vésiculaire. La GTPase est activée à la membrane par une GEF (1) et va recruter les protéines du manteau ainsi que la GAP (2) mais aussi toutes les molécules cargos dans une vésicule naissante(3). Les protéines du manteau permettent la courbure de la membrane et la scission de la vésicule (4). Après transport de la vésicule, les complexes du manteau sont dissociés (5), les vésicules sont attachées à la membrane cible par les « tethering factors » et les protéines SNARE permettent la fusion des membranes (6). Les molécules cargos sont alors relâchées dans le compartiment accepteur. (Szul and Sztul, 2011)

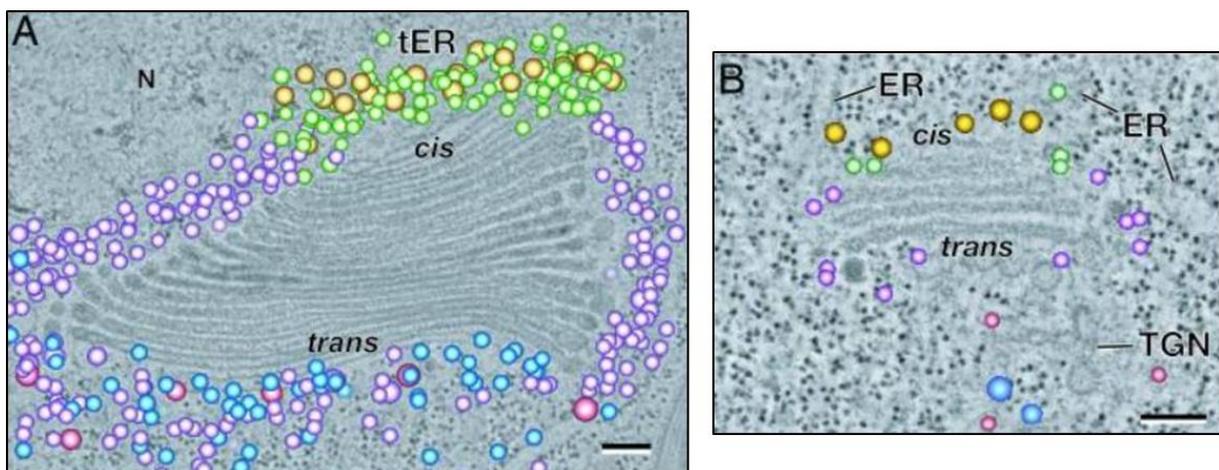


Figure I-5 : Tomogramme 3D d'un dictyosome d'algue, *Scherffelia dubia* (A) et de plante supérieure, *Arabidopsis thaliana* (B). Les différents types de vésicules sont colorées de la manière suivante : en jaune COPII, en vert COPIa, en violet COPIb, en rose les vésicules à clathrine et en bleu les vacuoles contractiles pour *S. dubia* et les vésicules de sécrétion pour *A. thaliana*. La barre d'échelle représente 100nm. (Donohoe et al., 2007)

Le saccule *trans*-golgien est ensuite transformé en vésicules du réseau *trans*-golgien TGN (*trans*-golgi network). C'est lors de cette étape que les protéines sont triées afin de rejoindre leur compartiment de destination. Ainsi une protéine adressée aux lysosomes ne sera pas dans la même vésicule qu'une protéine destinée à la membrane plasmique. Le TGN est aussi un lieu d'échange entre la voie sécrétoire et la voie d'endocytose et il existe en tant qu'organelle indépendante chez les plantes (Dettmer et al., 2006; Meel and Klumperman, 2008).

C'est au sein de l'appareil de Golgi que les composés carbonés nécessaires à la formation de la paroi des cellules végétales et que les protéines glycosylées de la matrice extracellulaire des cellules animales sont modifiées (Farquhar and Palade, 1998; Keegstra and Raikhel, 2001). De plus l'appareil de Golgi est la plateforme centrale du transport rétrograde et antérograde de la voie sécrétoire (Altan-Bonnet et al., 2004) et il est le siège de nombreuses voies de signalisation (Kondoh et al., 2005; Matteis and Morrow, 2000).

I.3 Interface RE-Golgi : différences et similitudes des plantes par rapport aux autres eucaryotes

I.3.A Introduction : Description de l'interface RE-Golgi

Dans cette partie nous allons aborder les différences notables à l'interface RE-appareil de Golgi des cellules animales et végétales.

L'organisation de l'interface RE-appareil de Golgi est très variable selon les eucaryotes (Fig. I-6). L'une des différences majeures réside dans le fait que les cellules végétales possèdent un appareil de Golgi composé de dizaines voire de centaines de petits dictyosomes répartis dans la cellule sur un réseau RE/Actine alors que celui des cellules animales est en position péri-nucléaire et est composé d'un ensemble de plus grands dictyosomes. Dans les cellules mammifères en culture les différents saccules sont interconnectés par des tubules. Le RE et l'appareil de Golgi sont assez éloignés et un compartiment pléomorphe est observé entre les deux organites, c'est l'ERGIC (ER-Golgi Intermediate Compartment). Ceci est vraiment différent chez les végétaux car dans les cellules fortement vacuolisées, l'organisation de l'interface RE-Golgi est très compacte et les deux organites sont presque en contact (la distance les séparant est inférieure ou égale à 300nm (Kang and Staehelin, 2008)).

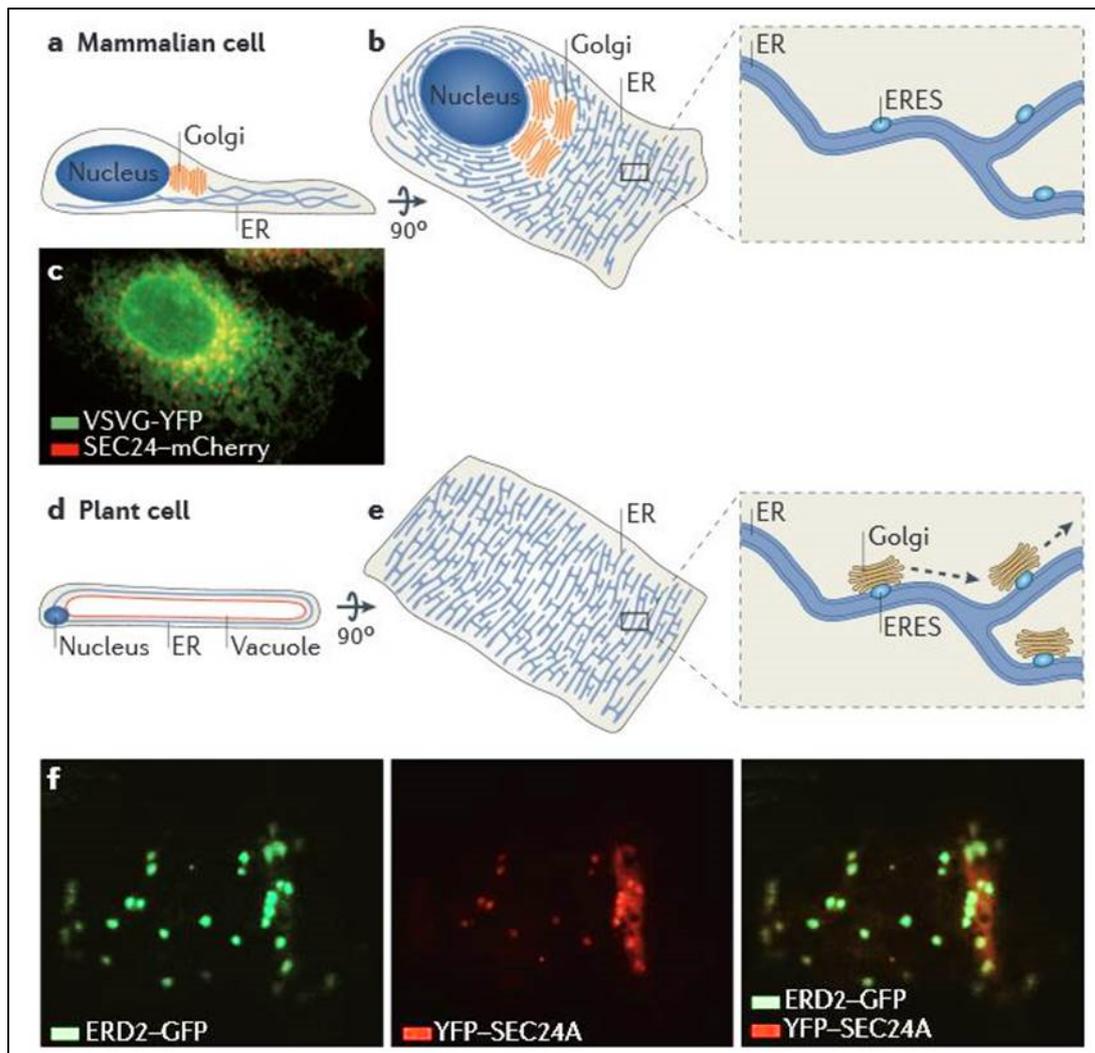


Figure I-6 : L'architecture de la cellule contribue à l'organisation de l'interface RE-appareil de Golgi et à la position des ERES dans les cellules de mammifère et de plante. Vue schématique de côté (a) ou de dessus (b) d'une cellule de mammifère en culture, représentant la position relative du noyau, du RE, de l'appareil de Golgi et des ERES. Les ERES sont dispersés sur l'ensemble du réseau de RE et sont concentrés dans la région proche de l'appareil de Golgi. Image de microscopie confocale d'une cellule d'hépatocarcinome exprimant Sec24-mCherry et VSVG-YFP, qui marquent respectivement les ERES et le RE. Coupe schématique d'une cellule végétale (d) montrant le RE comprimé entre le tonoplaste de la vacuole et la membrane plasmique. Schéma illustrant le réseau de RE au niveau cortical d'une cellule végétale (e). L'agrandissement montre la position des ERES et des dictyosomes golgien qui se déplacent le long du réseau de RE (flèches en pointillé). Images de microscopie confocale de cellules de l'épiderme de feuille de tabac exprimant Erd2-GFP et YFP-Sec24A, respectivement des marqueurs de l'appareil de Golgi et des ERES. Lorsque les deux images sont superposées, une colocalisation est observée entre les ERES et les dictyosomes. (Brandizzi and Barlowe, 2013)

Il existe aussi des variations au niveau de la localisation des lieux de formation des vésicules COPII (ERES pour ER Exit Sites), la nature du transport vésiculaire et sa dépendance au cytosquelette.

L'appareil de Golgi des mammifères est immobile et seul l'ERGIC change de conformation avec l'aide des microtubules (Presley et al., 1997). Deux modèles ont été élaborés. Premièrement le modèle mobile où l'ERGIC irait des ERES à l'appareil de Golgi en se déplaçant sur les microtubules et deuxièmement un modèle en deux étapes où l'ERGIC serait un compartiment statique où seules les vésicules COPII et COPI se déplaceraient. Les vésicules COPII seraient transportées à courte distance du RE vers l'ERGIC sans l'intervention des microtubules puis des vésicules riches en cargos iraient de l'ERGIC au compartiment *cis*-golgien à l'aide des microtubules. Les deux mécanismes ne sont cependant pas incompatibles, il est possible que le déplacement de l'ERGIC soit nécessaire à la sécrétion de macromolécules comme le pro-collagène et que le transport de cargos « normaux » se fasse avec des vésicules COPII.

Les dictyosomes des cellules végétales, quant à eux, sont très mobiles (jusqu'à 4µm par seconde) le long du RE (Nebenführ et al., 1999) grâce au cytosquelette d'actine ce qui nécessite l'activité des acto-myosines (Avisar et al., 2008; Peremyslov et al., 2008; Sparkes et al., 2008). Cependant cette mobilité entraîne la question suivante : comment l'export du RE a-t-il lieu pendant que les dictyosomes sont mobiles sur un réseau RE ? Une des hypothèses, le « stop and go », propose qu'un signal soit adressé au dictyosome par les ERES pour que celui-ci s'arrête le temps que le « chargement » ait lieu. Une fois toutes les vésicules COPII acheminées, le dictyosome peut alors reprendre son mouvement (Boevink et al., 1998; Nebenführ et al., 1999). Cette hypothèse suggère que les ERES soient répartis sur l'ensemble du RE en attendant que l'appareil de Golgi soit en interaction avec eux. Cependant les protéines du complexe COPII (Sar1, Sec23, Sec24, Sec13 et Sec31 ; voir la section I.3.B.a) sont retrouvées au sein de foyers étant continuellement en interaction avec la membrane *cis*-golgienne. Ceci appuie la deuxième hypothèse selon laquelle les ERES et l'appareil de Golgi peuvent être en constante interaction (daSilva et al., 2004). Il existe aussi une théorie hybride (Fig. I-7) où les vésicules COPII et COPI seraient formées lors du déplacement du dictyosome le long du RE et seraient accrochées par les facteurs de ciblage (« tethering factors » ; Lerich et al., 2012) aux dictyosomes mobiles (comme pour les ERES et l'appareil de Golgi en constante interaction) mais ne fusionneraient pas avant leur arrêt pendant lequel aucune vésicule COPII ne serait émise par les ERES (Lerich et al., 2012). Les vésicules COPII formées fusionneraient avec la membrane du Golgi et les vésicules

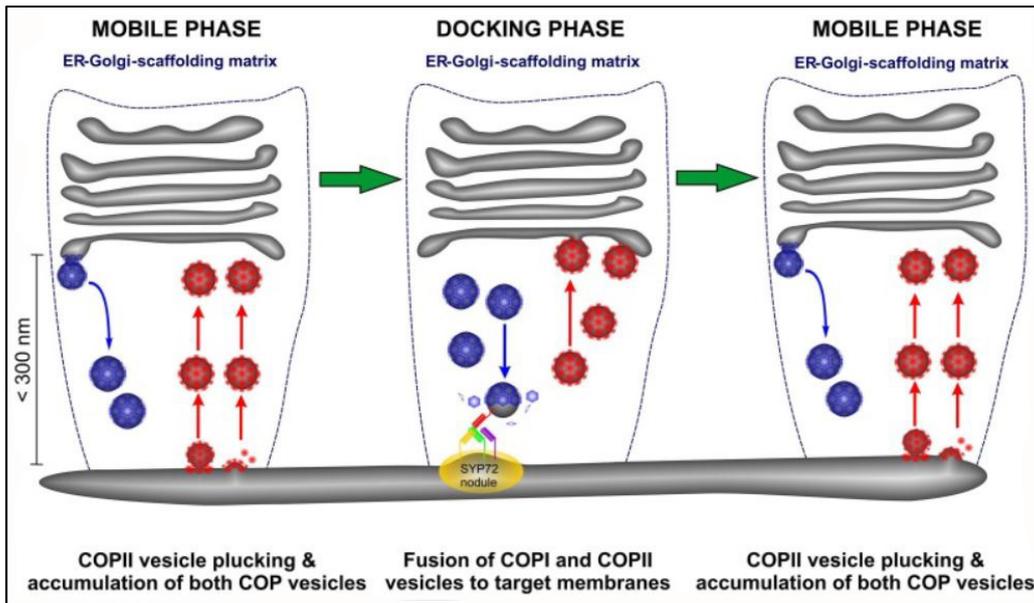


Figure I-7 : Théorie hybride : Trafic antérograde et rétrograde entre le RE et l'appareil de Golgi. Le dictyosome est en étroite association avec le RE grâce à une matrice formée par les « tethering factors » (ligne pointillée bleue). Pendant son déplacement, la matrice capture les vésicules COPII (rouge) et COPI (bleu) formées. Puis quand le dictyosome s'arrête, les vésicules fusionnent avec leur membrane de destination (*cis*-golgi pour COPII et RE pour COPI). L'ERES est le lieu de bourgeonnement des vésicules COPII et l'ERIS le lieu de fusion des vésicules COPI sur la membrane du RE, il est représenté par le nodule Syp72 (SNARE). (Lerich et al., 2012)

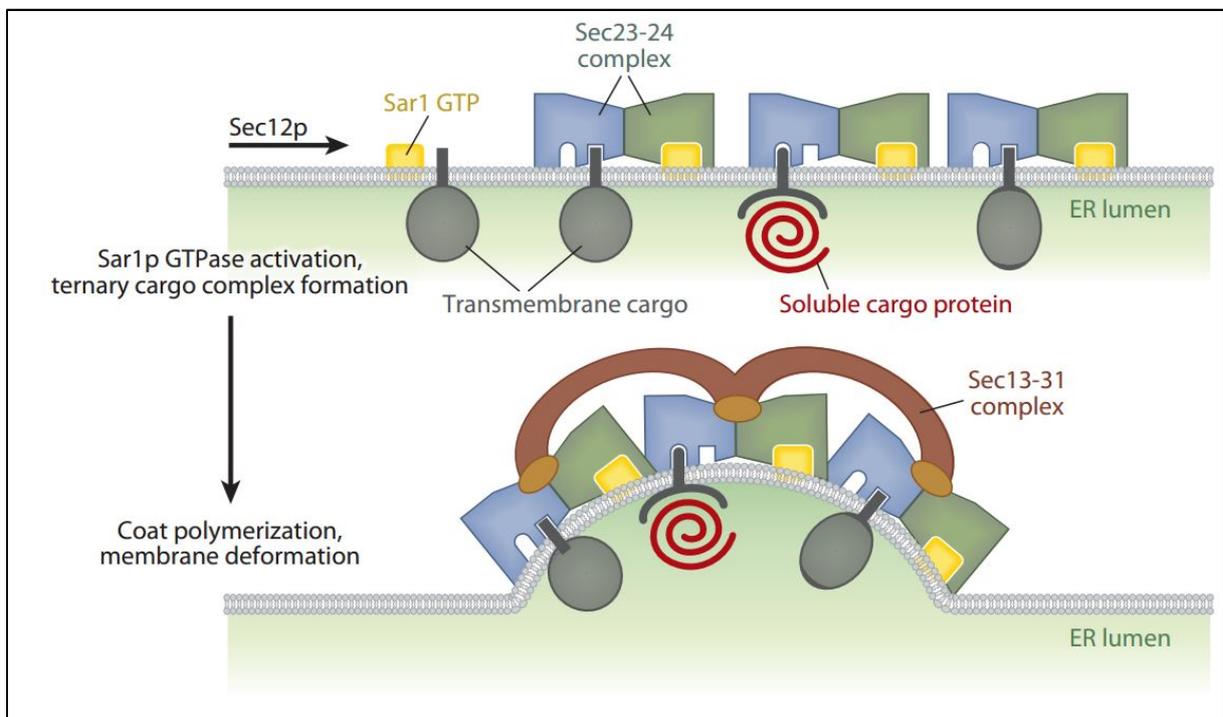


Figure I-8 : Modèle de recrutement dépendant des protéines de COPII des protéines cargo et de formation des vésicules COPII. Sar1-GDP est activée en Sar1-GTP par la GEF Sec12 à la membrane du RE. Sar1-GTP est ancrée à la membrane et se lie avec le complexe Sec23/Sec24. La sous-unité Sec24 interagit avec différents signaux d'export directement sur des protéines cargo ou bien sur des récepteurs de protéines cargo. Le complexe Sar1-Sec23/Sec24 recrute le sous-complexe Sec13/Sec31 et permet alors la polymérisation du manteau et la formation de la vésicule. (Dancourt and Barlowe, 2010)

COPI formées fusionneraient avec la membrane du RE en un lieu appelé ERIS (ER Import Sites). Puis les dictyosomes seraient de nouveau mobiles et ainsi de suite (Lerich et al., 2012).

I.3.B Bourgeoisement des vésicules de transport

Des études *in vitro* ont montré que la formation des vésicules COPI et COPII étaient fortement similaires et ne pouvaient nécessiter qu'un set restreint de protéines dont les complexes hétéromériques du manteau, les GTPases Arf1 (ADP-Ribosylation Factor 1) pour COPI et Sar1 (Secretion Associated RAS-related 1) pour COPII, les GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factor) et GAPs (GTPases-Activating Proteins) associées (Barlowe et al., 1994; Matsuoka et al., 1998). Cependant, *in vivo* d'autres protéines sont nécessaires à ces transports.

I.3.B.a Machinerie COPII

Tout d'abord de nombreuses protéines Sec16 sont recrutées au niveau des ERES afin de former un site d'export. Bien que les ERES varient en taille et en nombre, ils sont présents chez la majorité des eucaryotes. Les protéines Sec16 forment un échafaudage autour de l'ERES et semblent nécessaires au recrutement des différentes sous-unités de COPII (Bharucha et al., 2013; Hughes et al., 2009; Kung et al., 2012; Montegna et al., 2012; Whittle and Schwartz, 2010; Yorimitsu and Sato, 2012). La GTPase Sar1 sous sa forme GDP est recrutée à la membrane par une Guanine nucleotide Exchange Factor (GEF), la protéine Sec12 qui remplace le GDP de Sar1 par un GTP (Barlowe and Schekman, 1993; Fig. I-8). Sar1-GTP change alors de conformation et expose une hélice α amphipathique du côté de l'extrémité N-terminale, qui va s'ancrer à la membrane par l'interaction des résidus hydrophobes avec les phospholipides (Bi et al., 2002; Huang et al., 2001; Lee et al., 2005). Cet ancrage dans la membrane va initier le recourbement de la membrane (Antonny et al., 1997a; Lee et al., 2005; Matsuoka et al., 1998). Sar1 interagit avec la protéine Sec23 (Bi et al., 2002; Matsuoka et al., 1998) qui forme un hétérodimère avec Sec24. Cette interaction a été observée par cristallographie entre des protéines de levure et il a pu être déterminé que la zone d'interaction représente environ 20% de la surface de Sar1. Les protéines Sar1-GTP, Sec23 et Sec24 sont assemblées à la surface cytosolique de la membrane du RE et forment le manteau intérieur (Fig. I-8). Le complexe Sec23-Sec24 a une forme de nœud papillon avec la partie concave basique qui va interagir avec la membrane et initier sa courbure (Bi et al., 2002).

Il est intéressant de noter que dans les cellules végétales, le nombre d'ERES et le recrutement de Sec24 à la membrane du RE augmente lorsque des protéines cargo ayant un motif d'export du RE sont surexprimées de façon transitoire (Hanton et al., 2007). Dans les cellules animales, c'est plutôt une fusion des ERES qui est observée induisant une diminution du nombre de sites mais des ERES plus étendus. Une surproduction stable de ces protéines induit une augmentation du nombre et de la taille des ERES ainsi qu'une augmentation du nombre de protéines Sec24 et Sec16. Dans ce cas c'est la machinerie UPR qui va induire ces changements. De plus dans les cellules des vertébrés, l'export de certaines macromolécules comme le procollagène (330nm x 1,5nm) ou les pré-chylomicrons (100 à 500nm de diamètre) nécessitent l'intervention de protéines membranaires localisées au niveau des ERES qui vont aider à la formation de vésicules COPII plus grandes car la taille caractéristique d'une vésicule est comprise entre 60 et 100nm (Saito et al., 2011). Ce mécanisme n'est pas retrouvé dans les cellules végétales car il n'y a pas de grosses macromolécules synthétisées dans le RE, par exemple les fibrilles de cellulose sont synthétisées directement au niveau de la membrane plasmique (Guerriero et al., 2010). Donc la taille et le type de cargo influencent la taille et le nombre d'ERES et modifient ainsi la régulation de l'interface RE-Golgi.

Bien qu'une partie du chargement des molécules cargos dans les vésicules se fasse de manière passive il existe des récepteurs qui recrutent certaines molécules. Dans les cellules animales les récepteurs sont de la famille p24, de la famille Erv et de la famille ERGIC-53 (Dancourt and Barlowe, 2010). Chez les plantes ce sont principalement des récepteurs de la famille p24 (Langhans et al., 2008; Montesinos et al., 2012, 2013). Tous ces récepteurs sont recrutés au niveau du lieu de bourgeonnement en interagissant avec Sec24. De plus la protéine Sec24 interagit avec la queue cytoplasmique de certaines protéines cargo transmembranaires et permet donc de les recruter au sein des vésicules naissantes. Dans les cellules humaines, il existe quatre paralogues de la protéine Sec24 ; les isoformes a et b interagissent avec les motifs DXE et LXXL/ME et les isoformes c et d avec le motif IXM (Mancias and Goldberg, 2008). Chez les plantes il y a aussi 4 paralogues de Sec24 et ce sont les motifs acides comme DXE et EXXD (ELAD) ou basiques tel que RXX/XXR, RKR et KXRXX qui permettent l'export du RE (Marti et al., 2010). Cette différence de reconnaissance laisse à penser que le contenu des vésicules COPII peut être régulé en fonction de l'isoforme de Sec24 et des récepteurs présents.

Sar1 et Sec23 interagissent directement avec Sec31 (Bi et al., 2007) et recrutent alors le sous-complexe Sec13-Sec31 (Fig. I-8). Ces protéines forment le manteau extérieur et permettent de courber la membrane afin de créer le bourgeonnement membranaire et la fission ; de plus,

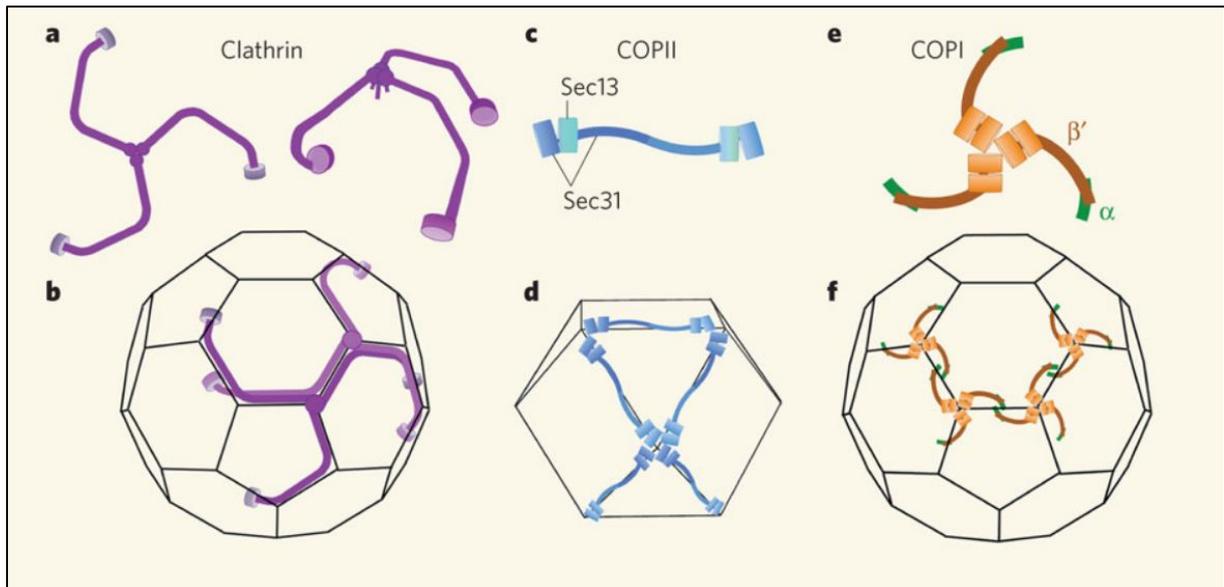


Figure I-9 : Représentation schématique des protéines de manteau et leur assemblage. A) deux vues d'un triskélium de clathrine. B) Assemblage des triskélium afin de former un manteau icosaédral de clathrines. C) et D) le complexe dimérique Sec13/Sec31 permet de former une structure cuboctaédrale pour la formation du manteau COPII. E) et F) trois complexes α -COP et β' -COP forment un triskélium semblable à celui formé par la clathrine. L'arrangement de ces triskélium pour former la structure du manteau est purement spéculatif. Les structures de manteau sont représentées approximativement à l'échelle, le diamètre extérieur de la structure de la clathrine (B) est d'environ 90 nm. (Harrison and Kirchhausen, 2010)

elles vont avoir un rôle d'échafaudage en formant la cage et en maintenant la forme des vésicules. Ce sous complexe est en fait un tétramère composé de deux couples Sec13/Sec31 formant un bâtonnet. *In vitro* ces structures s'assemblent et créent des cages géométriques (Fath et al., 2007) (Fig. I-9).

La protéine Sec23 possède une activité GAP (« GTPase-Activating Protein ») qui va permettre à Sar1 d'hydrolyser le GTP et de revenir sous forme inactive (forme GDP). La présence de l'hélice α de Sar1 dans la membrane et l'hydrolyse de son GTP seraient nécessaires à la fission de la vésicule. En effet lorsque la protéine Sar1 ne présente plus cette hélice α ou que l'hydrolyse du GTP est bloquée, une inhibition du bourgeonnement est observée (Bielli et al., 2005; Lee et al., 2005). Avant la fusion de la vésicule avec la membrane de son compartiment accepteur (*cis*-Golgi pour les cellules végétales et ERGIC pour les cellules animales), les vésicules perdent les protéines du manteau. Cette étape est elle aussi assurée par l'hydrolyse du GTP de Sar1 car cela déstabilise l'interaction entre les composants du manteau et la membrane (Antonny et al., 2001; Barlowe et al., 1994).

La connaissance des mécanismes de recrutement à la membrane de Sar1 et son activité de GTPase sont connues mais il est tout de même compliqué de comprendre sa participation dans la régulation de la formation des vésicules COPII. Ainsi il a été montré que bien que Sar1-GTP recrute Sec23/24 à la membrane, des protéines cargo membranaires pouvaient avoir une affinité directe avec le complexe Sec23/24 et elles aussi être recrutées à la membrane dans des liposomes synthétiques. Le rôle de Sar1-GTP dans ce contexte serait celui de régulateur plutôt que d'ancre de recrutement et une étude a montré que l'hydrolyse du GTP par Sar1 influence la concentration des cargos lors du chargement des vésicules (Bi et al., 2002).

Arabidopsis thaliana possède plusieurs homologues pour chaque protéine de cette machinerie (Table I): 5 pour Sec23, 4 pour Sec24, 2 pour Sec13 et 2 pour Sec31, mais aussi 5 homologues de la GTPase Sar1 et 2 homologues de la GEF Sec12 (Bassham et al., 2008; Sanderfoot and Raikhel, 2003).

I.3.B.b Machinerie COPI

Les vésicules COPI permettent le transport rétrograde intra-golgien et du Golgi vers le RE. Ce sont de petites vésicules dont le diamètre est compris entre 50 et 100nm. Elles assurent,

COPII		COPI	
Sec13	At3g01340	B-COP	
	At2g30050	α -COP	At1g62020
Sec31	At1g18830		At2g21390
	At3g63460	β' -COP	At1g52360
Sec23	At3g23660		At3g15980
	At1g05520		At1g79990
	At5g43670	ϵ -COP	At2g34840
	At4g14160		At1g30630
	At2g21630	F-COP	
Sec24	At3g07100	β -COP	At4g31480
	At4g32640		At4g31490
	At2g27460	γ -COP	At4g34450
	At4g32640	δ -COP	At5g05010
		ζ -COP	At1g60970
			At3g09800
			At1g08520
Sar1-GTPases		Arf-GTPases	
SarA1a	At1g09180	ArfA1a	At1g23490
SarA1b	At1g56330	ArfA1b	At5g14670
SarA1c	At4g02080	ArfA1c	At2g47170
SarA1d	At3g62560	ArfA1d	At1g70490
SarA1e	At1g02620	ArfA1e	At3g62290
		ArfA1f	At1g10630
		ArfB1a	At2g15310
		ArfB1b	At5g17060
		ArfB1c	At3g03120
		ArfD1a	At1g02440
		ArfD1b	At1g02430
Sar1-GEF		Arf-GEF	
Sec12	At2g01470	Sec7/BIG-type	At4g35380
	At5g50550		At3g43300
			At4g38200
			At1g01960
			At3g60860
		Gnom-Type	At1g13980
			At5g39500
			At5g19610

Table I : Protéines des machineries COPII et COPI chez *Arabidopsis thaliana*.

entre autres, le retour au sein du RE des protéines résidentes et le recyclage de certaines protéines de la machinerie COPII.

Pour initier la formation d'une vésicule COPI, la GTPase Arf1-GDP est activée par le domaine Sec7 d'une GEF (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006) et se retrouve ancrée à la membrane de l'appareil de Golgi (Fig. I-10). Le passage d'Arf1 de la forme GDP à GTP induit un changement de conformation qui libère une hélice α amphipathique ainsi qu'un groupement myristoyl en N-terminal de la protéine qui vont faciliter l'ancrage à la membrane (Antonny et al., 1997a). Gbf1, la seule GEF connue localisée au niveau *cis*-golgien, joue un rôle important dans la régulation du trafic des protéines entre le RE et le *cis*-Golgi (Claude et al., 1999; Kawamoto et al., 2002). Elle y recrute les 7 protéines de COPI regroupées en deux sous-complexes. Le premier, le sous-complexe F-COPI est composé de β -COP, γ -COP, δ -COP et ζ -COP et le second permettant la formation de la cage, le sous-complexe appelé B-COPI composé d' α -COP, β' -COP et de ϵ -COP. Les sous-unités α , β' , γ et δ -COP reconnaissent des motifs particuliers des protéines cargos et permettent leur regroupement au sein des vésicules COPI en formation (Fig. I-10). Les motifs majeurs pour le retour des cargos vers le RE sont le motif HDEL pour les protéines solubles et le motif K(X)KXX pour les protéines membranaires. Le récepteur Erd2 reconnaît le motif HDEL et permet l'association de la protéine soluble aux protéines de COPI (Semenza et al., 1990). Le motif K(X)KXX doit être en C-terminal de la protéine cargo et proche de la membrane pour que la protéine soit intégrée aux vésicules COPI. D'autres motifs basiques ou di-aromatiques existent et doivent eux aussi avoir une position particulière pour être reconnus (Cosson et al., 1998; Shikano and Li, 2003). En plus d'Erd2, Rer1 est un récepteur membranaire qui prend en charge les protéines résidentes du RE comme la protéine Sec12 (GEF de Sar1) ou bien les composants du canal de translocation, Sec63 et Sec71. La protéine Rer1 possède plusieurs sites permettant l'interaction avec les cargos et peut donc accrocher plusieurs protéines simultanément (Sato et al., 2003). Ce récepteur a une affinité avec les protéines cargos au niveau des résidus polaires au sein de l'hélice hydrophobe des domaines transmembranaires (Sato et al., 2001, 1996).

Contrairement à la machinerie COPII, la GAP d'Arf1 ne fait pas partie du manteau COPI. Dans les cellules de mammifère c'est la protéine ArfGAP1 qui assure l'activation d'Arf1. Chez la levure, les GAP Glo3 et Gcs1 localisées au niveau de l'appareil de Golgi joueraient ce rôle (Dogic et al., 1999; Phi Poon et al., 1999). ArfGAP1 utilise un domaine « lipid-packing sensor » pour réguler son activité en fonction de la courbure de la membrane et elle devient active lorsque la courbure est très prononcée comme lorsque la vésicule est formée ou du moins que sa

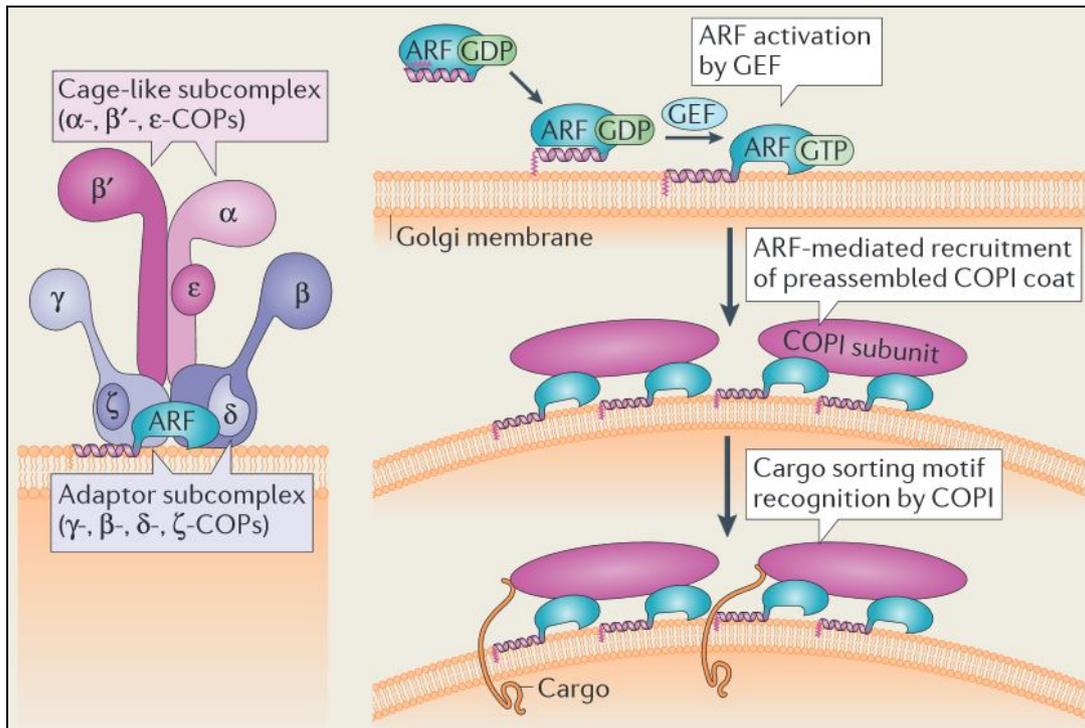


Figure I-10 : Le complexe COPI est formé de 7 sous-unités. Après activation d'Arf1 par une GEF, elle change de conformation et s'ancre à la membrane grâce à une hélice α hydrophobe et une myristoylation. Arf1-GTP associée à la membrane *cis*-golgienne recrute alors les sous unités du complexe COPI qui vont elles-mêmes recruter les protéines cargos. (Brandizzi and Barlowe, 2013)

formation est assez avancée pour ne plus dépendre d'Arf1 (Bigay et al., 2003, 2005). La protéine de levure Gcs1 semble posséder le même mécanisme car elle s'attache préférentiellement aux lipides coniques (Antonny et al., 1997b). Mais la régulation de l'activité de la GAP ne serait pas simplement lipide-dépendante ; les protéines COP ainsi que les protéines cargo sembleraient elles aussi intervenir (Goldberg, 2000; Luo and Randazzo, 2008; Springer et al., 1999). De façon étonnante chez la levure, les ArfGAPs seraient des régulateurs positifs de la formation du manteau COPI plutôt que des régulateurs négatifs car en sur-exprimant une ArfGAP la létalité de la mutation *arf1* est supprimée (Zhang et al., 1998, 2003). Donc pour conclure, le rôle des ArfGAPs dans le processus de transport rétrograde n'a pas encore été clairement défini.

La structure et le mécanisme de COPI sont très proches de ceux de la clathrine. Les chaînes lourde et légère de la clathrine polymérisent pour former une cage constituant la partie externe du manteau. La partie interne faisant le lien entre la membrane et la cage, est composée de protéines adaptatrices (complexe AP2). Ces protéines adaptatrices varient suivant le lieu de formation de la vésicule (Robinson, 2004). D'un point de vue structural, γ -COP et ζ -COP sont respectivement semblables aux sous-unités β AP2 (Hoffman et al., 2003; Watson et al., 2004) et σ AP2 (Yu et al., 2009) du complexe AP2. Pour ce qui est de la formation de la cage, le sous-complexe $\alpha/\beta'/\epsilon$ -COP et les sous-unités de la clathrine sont fortement similaires (Hsia and Hoelz, 2010; Lee and Goldberg, 2010) et forment une structure à trois branches appelée triskélion (Fig. I-9).

Le génome d'*Arabidopsis thaliana* code pour 11 GTPases Arf, 8 homologues de l'Arf-GEF et 15 ArfGAP (Anders and Jürgens, 2008; Jürgens and Geldner, 2002; Vernoud et al., 2003). A l'exception de δ -COP et γ -COP, *A. thaliana* possède plusieurs gènes qui codent pour des protéines COPI. Ainsi il y a trois isoformes de β' -COP et de ζ -COP et deux isoformes de α -COP, β -COP et de ϵ -COP (Bassham et al., 2008; Robinson et al., 2007) (Table II). La multitude de protéines COP peut refléter l'existence de plusieurs classes de vésicules COPI. Chez *A. thaliana*, deux tailles de vésicules COPI ont été observées, les COPIa provenant de la membrane *cis*-golgienne et donc assurant le transport : appareil de Golgi-RE et les COPIb observées au niveau médian et *trans*-golgien et qui seraient nécessaires au transport intra-golgien (Fig. I-11) (Donohoe et al., 2007).

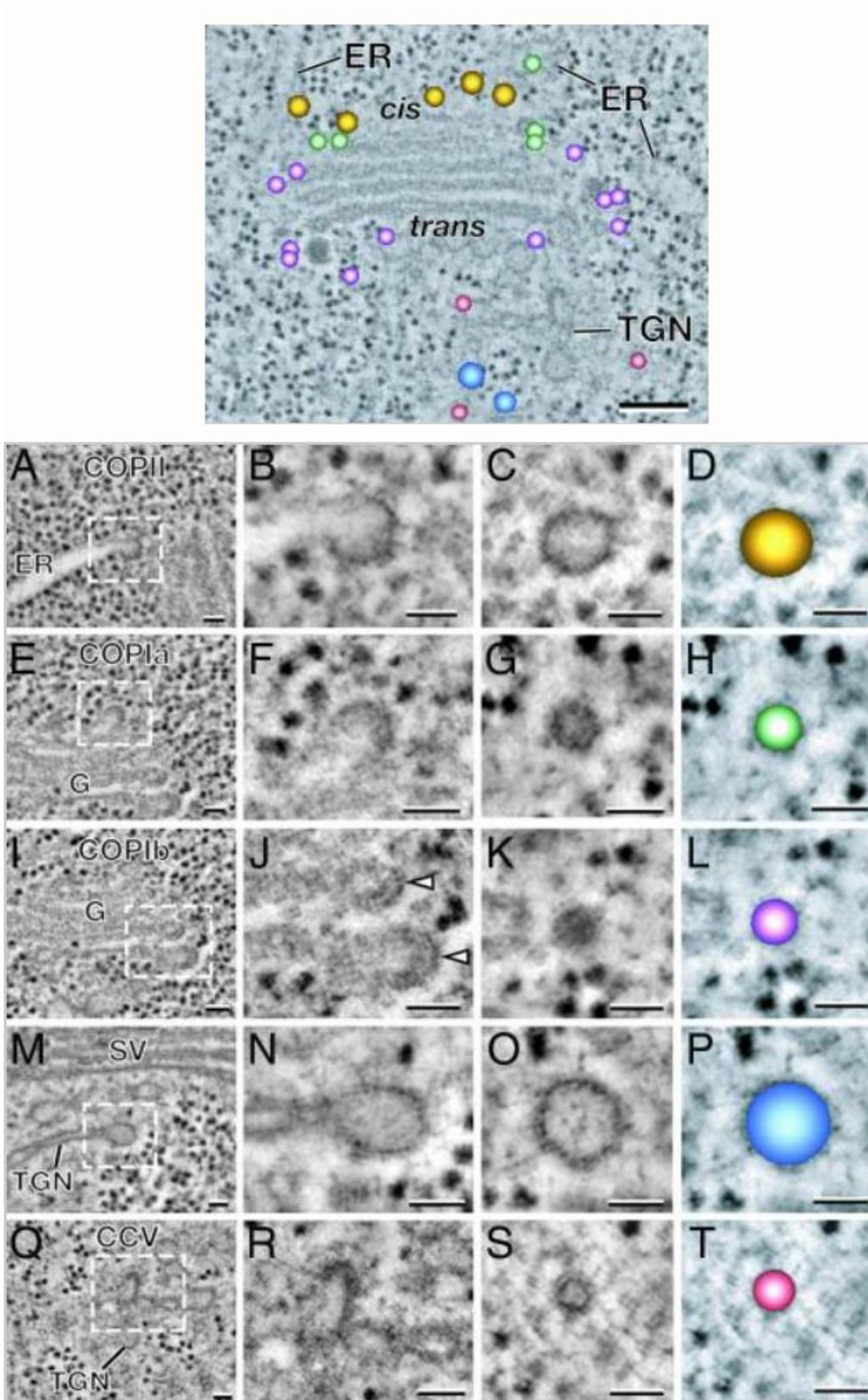


Figure I-11 : En haut : Tomogramme d'un dictyosome golgien d'*A. thaliana* (la barre d'échelle correspond à 100nm). Dessous : galerie d'images de tomographie de vésicules COPII (A-D), COPIa (E-H), COPIb (I-L), de vésicules de sécrétion (M-P) et de vésicules entourées de clathrine (Q-T) effectuées sur des cellules d'*Arabidopsis thaliana*. Le bourgeonnement des vésicules est montré dans la deuxième colonne et les vésicules libres dans la troisième. La quatrième colonne réutilise le code couleur de la figure I-5. La barre d'échelle correspond à 50nm. (Donohoe et al., 2007)

I.3.C Ciblage des vésicules et Fusion des membranes

Les vésicules fusionnent avec la membrane cible à travers une série d'évènements d'adressage et de fusion dépendants de machineries fortement conservées (Lorente-Rodriguez and Barlowe, 2011). Lors du transport antérograde, le ciblage de la membrane dépend des Ras-GTPases et de facteurs d'arrimage (« tethering factors ») puis la fusion des membranes dépend des protéines SNARE. La découverte des SNAREs et leurs mécanismes d'action chez les mammifères et la levure par J.E. Rothman, R. Sheckman et T. Südhof leur a valu d'être récompensés par le prix Nobel de Physiologie et Médecine cette année.

Comme pour le bourgeonnement (GTPases Sar1 et Arf1), l'arrimage des vésicules à la membrane cible nécessite l'action d'une protéine de la famille des Ras-GTPases. Cette étape lors du transport antérograde RE-appareil de Golgi est assurée par une Rab, Ypt1 chez la levure et Rab1 chez les mammifères. Par contre chez *A. thaliana*, deux Rabs sont localisées à cette interface Rab1/RabD et Rab2/RabB.

Les Rabs, comme Arf1 et Sar1 sont des protéines cytosoliques qui s'ancrent à la membrane sous forme active. Cependant, la forme cytosolique est couplée à une protéine GDI (GDP dissociation inhibitor) qui masque l'ancre geranylgeranyl de la GTPase et ainsi l'empêche de s'ancrer à la membrane. Avant de commencer un cycle d'activation, un facteur va permettre le déplacement de la protéine GDI, c'est le GDF (GDI Displacement Factor). L'activation peut alors se faire par l'action d'une GEF qui remplace le GDP par un GTP. Rab-GTP s'ancre à la membrane puis une GAP va permettre l'hydrolyse du GTP et Rab-GDP va de nouveau interagir avec la protéine GDI et provoquer son retour dans le cytosol (Saito and Ueda, 2009).

Outre la GTPase, le ciblage des vésicules COPII nécessite l'intervention de facteurs d'ancrage (« tethering factors ») (Fig. I-12). Il en existe deux classes, les protéines possédant un long domaine coiled-coil (famille des p115) et les gros complexes multi-protéiques comme TRAPPI (TRANsport Protein Particle I) (Allan et al., 2000; Cai et al., 2007; Cao et al., 1998). Chez la levure (Fig. I-12), le complexe TRAPPI se lie à Sec23 à la surface de la vésicule COPII et permet l'activation de la GTPase Ypt1 (le complexe TRAPPI agissant aussi en tant que GEF d'Ypt1). Ypt1-GTP va alors recruter les protéines Uso1p (de la famille des p115) formant un dimère et qui peut couvrir une distance supérieure à 180nm (Yamakawa et al., 1996). Cependant d'autres protéines possédant un long domaine coiled-coil semblent nécessaires

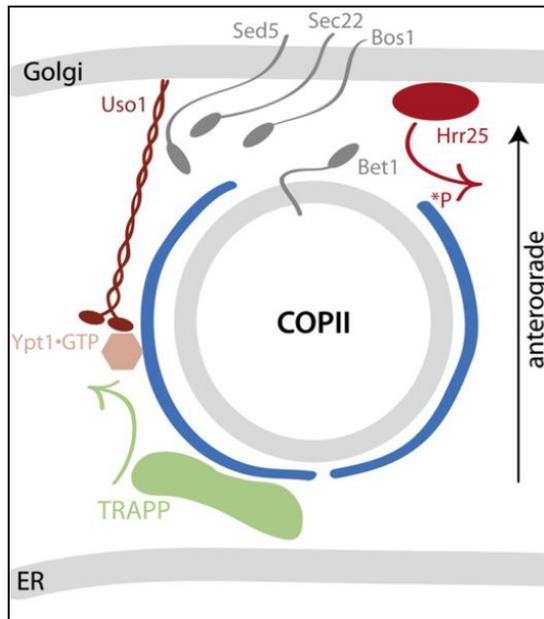


Figure I-12 : Ancrage des vésicules COPII à la membrane de l'appareil de Golgi. Chez la levure, le complexe TRAPPI interagit avec Sec23 à la surface de la vésicule COPII et permet l'activation d'Ypt1 (Famille des Rab-GTPases). Ypt1-GTP recrute alors d'autres effecteurs comme Uso1 qui possède un long domaine coiled-coil. Une kinase golgienne, Hrr25, phosphoryle Sec23 et déplace le complexe TRAPPI ce qui semble engendrer le désassemblage du manteau COPII. (d'après Barlowe and Miller, 2013)

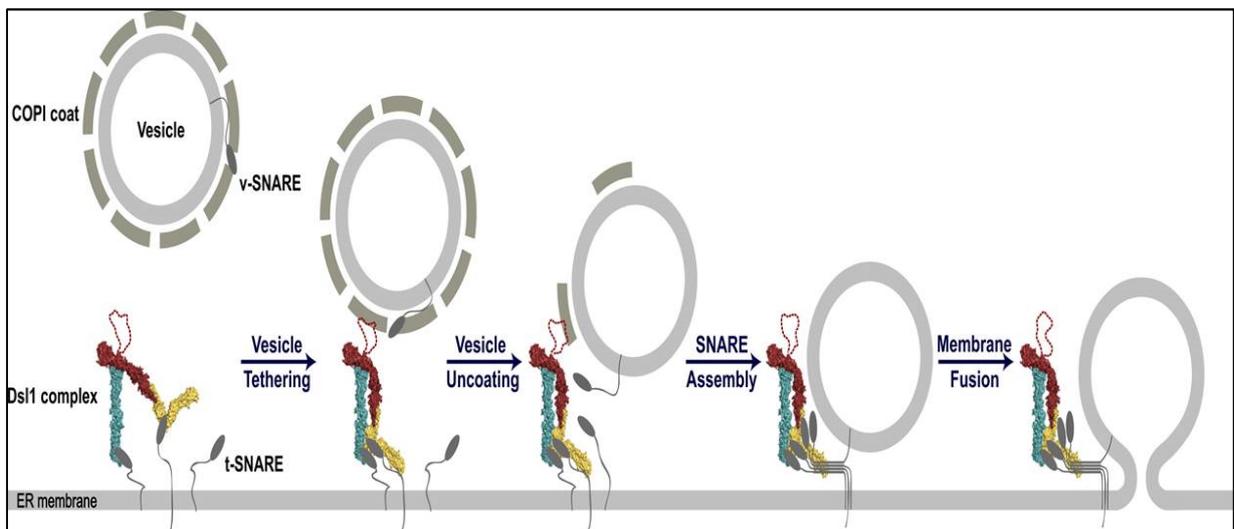


Figure I-13 : Ciblage de la vésicule COPI à la membrane par le complexe Dsl1 (Ren et al., 2009). Sont représentés, en bleu Sec39, en jaune Tip20 et en rouge Dsl1. Dsl1 interagit avec le manteau COPI, l'attire vers la membrane du RE et permet le désassemblage du manteau. Les protéines SNARE ainsi rapprochées peuvent engendrer la fusion des membranes.

(Barlowe and Miller, 2013). Une kinase localisée au niveau de l'appareil de Golgi phosphoryle le complexe Sec23/Sec24 (COPII) ce qui va réguler l'interaction de Sec23 avec le complexe TRAPPI puis son déplacement et peut être le désassemblage du manteau COPII (Lord et al., 2011). Cet événement de phosphorylation est conservé chez les mammifères. Les SNAREs sont alors accessibles pour initier la fusion des membranes.

Chez *A. thaliana*, les orthologues des sous unités du complexe TRAPPI de la levure et des mammifères sont présents mais aucune étude n'a été réalisée sur leur mécanisme et leurs implications lors du transport antérograde RE-appareil de Golgi.

Le transport rétrograde nécessite lui aussi des facteurs d'arrimage à longue distance puis des SNAREs afin de fusionner les membranes (Spang, 2012). Les vésicules COPI sont liées à la membrane du RE par le complexe Dsl1 composé des protéines Dsl1, Sec39 et Tip20 chez la levure (Zink et al., 2009) et par le complexe ZW10 composé de Rint1, Zw10 et Nag chez l'homme (Aoki et al., 2009). Récemment, il a été montré que chez *Arabidopsis thaliana*, les protéines Mag2, Mip1 et Mip2 sembleraient former un complexe homologue à Dsl1 (Li et al., 2013).

De récentes études structurales ont permis de créer un modèle mécanistique du recrutement des vésicules COPI chez la levure (Ren et al., 2009; Tripathi et al., 2009; Zink et al., 2009; Fig. I-13). Une longue tige formée principalement par Sec39 partirait de la membrane du RE et Dsl1, placée à l'extrémité de cette tige, permettrait le recrutement des vésicules COPI se trouvant à sa proximité. La protéine Sec39 est attachée à la membrane du RE par son interaction avec la SNARE Use1. Tip20 possède elle aussi un motif d'interaction avec les SNAREs et interagit avec le domaine N-terminal de Sec20. Le complexe Dsl1 semble aussi jouer un rôle lors de la fusion des membranes en stabilisant le complexe SNARE et permettrait le désassemblage des protéines du manteau COPI (Barlowe and Miller, 2013).

En termes d'énergie, la fusion de deux membranes est un processus plutôt défavorable. Cela nécessite l'intervention des protéines SNARE (Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptor) qui sont présentes sur les deux membranes et forment un complexe permettant de franchir la barrière énergétique.

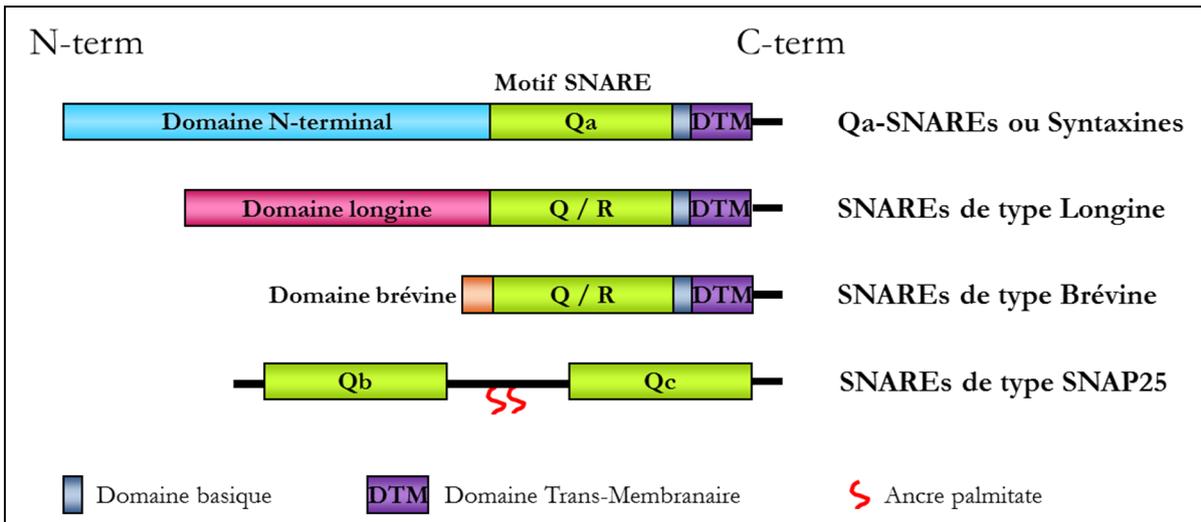


Figure I-14 : Structure générale des SNAREs. Les Qa-SNAREs ou Syntaxines possèdent un long domaine N-terminal, les autres SNAREs ayant un long domaine N-terminal sont appelées longines et celles ayant un court domaine sont appelées brévines. Les SNAREs de type SNAP25 possèdent deux domaines SNAREs et sont ancrées à la membrane par deux ancres palmitate.

I.3.C.a Mécanisme d'action des SNAREs

La plupart des SNAREs sont de petites protéines membranaires de type II (200 à 400 acides aminés). Elles sont composées, de l'extrémité C-terminale à N-terminale, de :

- un court domaine C-terminal (quelques acides aminés) orienté vers l'intérieur de l'organelle ou le milieu extracellulaire
- un domaine transmembranaire
- un court domaine basique
- un domaine coiled-coil (aussi appelé domaine SNARE)
- un domaine N-terminal de longueur variable qui permet de réguler les interactions

Quelques protéines SNARE ne possèdent pas de domaine transmembranaire et sont ancrées à la membrane par des acylations post-traductionnelles (palmitoylation ou isoprenylation)(Jahn and Scheller, 2006).

Le domaine SNARE est composé d'une hélice α de 60-70 acides aminés qui forme un domaine coiled-coil nécessaire au mécanisme de fusion. Chaque protéine SNARE possède un seul de ces domaines à l'exception des protéines de type SNAP25 qui en ont deux (Fig. I-14).

Il existe deux manières de classer les SNAREs. Premièrement la classification fonctionnelle où elles sont réparties suivant leur action lors de la fusion, les v-SNAREs sont sur la membrane de la vésicule (v pour « vesicle ») et les t-SNAREs sur la membrane cible (t pour « target »)(Söllner et al., 1993a). Cependant cette classification pose un problème par exemple lors des fusions de vésicules entre elles. La classification structurale semble donc plus appropriée, elle repose sur l'identité de l'acide aminé présent au centre du domaine SNARE : une arginine (R) ou une glutamine (Q). Généralement les t-SNAREs correspondent aux Q-SNAREs et les v-SNAREs aux R-SNAREs.

Les trois protéines présentes sur la membrane cible permettent de former le complexe *cis*-SNARE et sont subdivisées en Qa-, Qb- et Qc-SNAREs (Bock et al., 2001; Fasshauer et al., 1998). Les protéines de type SNAP25 possèdent quant à elles les domaines Qb et Qc.

Dans les cellules de mammifères, le complexe SNARE typique est composé des domaines Qa-SNARE (semblable à la syntaxine1), Qb-SNARE (semblable à la moitié N-terminale de SNAP25) et Qc-SNARE (semblable à la moitié C-terminale de SNAP25) sur la membrane cible

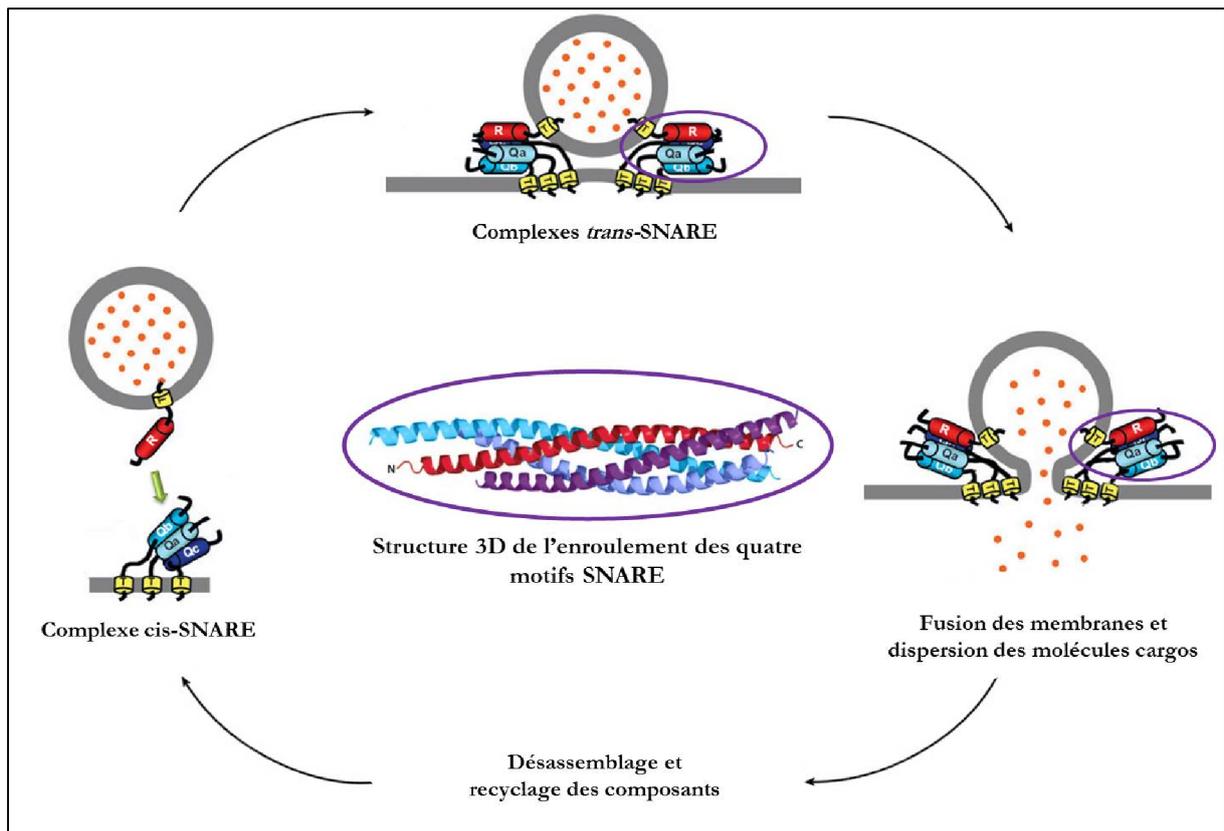


Figure I-15 : Cycle des SNAREs. Les Q-SNAREs de la membrane cible forment un complexe *cis*-SNARE qui permet le recrutement de la R-SNARE de la vésicule. Le complexe *trans*-SNARE ainsi formé permet le rapprochement des membranes jusqu'à leur fusion. Le complexe SNARE est composé de quatre hélices alpha enroulées sur elles-mêmes (structure 3D au centre d'après Strop et al., 2008). Les molécules cargos peuvent alors être dispersées dans le compartiment accepteur. Le complexe SNARE est ensuite désassemblé par les protéines SNAP et NSF et la R-SNARE est acheminée vers le compartiment donneur. Un nouveau cycle peut alors commencer. (modifié d'après Lipka et al., 2007)

et R-SNARE sur la vésicule (Bock et al., 2001). Le même schéma semble être conservé chez les plantes (Sutter et al., 2006).

Les Qb, Qc et R-SNAREs possèdent soit un domaine N-terminal long et sont appelées longines soit un domaine court et sont appelées brevines.

Le mécanisme permettant le rapprochement et la fusion des membranes est le suivant (Fig. I-15). Tout d'abord, un complexe *cis*-SNARE composé de trois domaines SNARE, Qa/Qb/Qc donc de deux ou trois protéines, est formé sur la membrane cible. Ce premier complexe va attirer le domaine R-SNARE de la protéine présente sur la vésicule et le tout va former le complexe *trans*-SNARE. Les quatre hélices s'enroulent l'une autour de l'autre, de la partie N-terminale vers la partie C-terminale (la plus proche de la membrane) (Hanson et al., 1997a; Hua and Charlton, 1999; Melia et al., 2002; Pobbati et al., 2006). La formation de ce complexe produit assez d'énergie pour surpasser la répulsion qui s'exerce entre les deux membranes permettant ainsi leur rapprochement jusqu'à la fusion. Le complexe ainsi formé est très stable et reste assemblé même après la fusion. Certains complexes synaptiques sont tellement stables qu'ils ne peuvent être dénaturé ni par le SDS ni par la chaleur (80°C) (Hayashi et al., 1994).

In vitro, les protéines SNARE constituent la machinerie minimum nécessaire à la fusion des membranes (Hu et al., 2003; Weber et al., 1998). Par contre, chaque SNARE est spécifique d'un complexe et elles ne sont pas interchangeables même s'il arrive qu'une même SNARE fasse partie de deux complexes différents comme c'est le cas pour Sed5p chez *S. cerevisiae*. Cette protéine permet la fusion de vésicules COPII avec l'appareil de Golgi dans le complexe Sed5p/Bos1p/Sec22p/Bet1p mais elle est aussi capable de former un complexe avec Gos1p, Ykt6 et Sft1 pour le transport rétrograde (Parlati et al., 2002).

Le domaine N-terminal des SNAREs permet de réguler la formation du complexe SNARE. Par exemple les Qa-SNAREs (aussi appelées syntaxines en raison de leur découverte) possèdent un domaine N-terminal important qui est un site de liaison pour les protéines SM (Sec1/Munc18-1) (Colbert et al., 2013; Park et al., 2012; Pertsinidis et al., 2013; Yu et al., 2013). Dans certaines de ces protéines ce domaine se replie sur le domaine coiled-coil et mime la formation du complexe SNARE. La protéine est alors dite en position fermée car elle ne peut pas interagir avec d'autres SNAREs et une cascade de régulation est nécessaire pour son ouverture (Dulubova et al., 1999). Pour d'autres Qa-SNAREs, les protéines SM permettent de garder les

Qa-SNAREs (syntaxines)		Qb-SNAREs	
Syp111 (Knolle)	At1g08560	Vti11	At5g39510
Syp112	At2g18260	Vti12	At1g26670
Syp121	At3g11820	Vti13	At3g29100
Syp122	At3g52400	Vti14	At5g39630
Syp123	At4g03330	Gos11	At1g15880
Syp124	At1g61290	Gos12	At2g45200
Syp125	At1g11250	Memb11	At2g36900
Syp131	At3g03800	Memb12	At5g50440
Syp132	At5g08080	Npsn11	At2g35190
Syp21 (Pep12)	At5g16830	Npsn12	At1g48240
Syp22 (Vam3)	At5g46860	Npsn13	At3g17440
Syp23	At4g17730	Sec20	At3g24315
Syp24	At1g32270		
Syp31	At5g05760		
Syp32	At3g24350		
Syp41	At5g26980		
Syp42	At4g02195		
Syp43	At3g05710		
Syp81	At1g51740		
R-SNAREs		Qc-SNAREs	
Vamp711	At4g32150	Bet11	At3g58170
Vamp712	At2g25340	Bet12	At4g14455
Vamp713	At5g11150	Syp51	At1g16240
Vamp714	At5g22360	Syp52	At1g79590
Vamp721	At1g04750	Syp61	At1g28490
Vamp722	At2g33120	Syp71	At3g09740
Vamp723	At2g33110	Syp72	At3g45280
Vamp724	At4g15780	Syp73	At3g61450
Vamp725	At2g32670	Sft11	At4g14600
Vamp726	At1g04760	Sft12	At1g29060
Vamp727	At3g54300	Use11	At1g54110
Vamp728	At3g24890	Use12	At3g55600
Ykt61	At5g58060		
Ykt62	At5g58180		
Sec221	At1g11890		
Sec222	At5g52270		
Qb+Qc-SNAREs (SNAP-25-like)			
Snap29	At5g07880		
Snap30	At1g13890		
Snap33	At5g61210		

Table II : Référencement des différentes SNAREs d'*Arabidopsis thaliana* (en gris sont surlignées les SNAREs de l'interface RE-appareil de Golgi). (Lipka et al., 2007; Saito and Ueda, 2009; Sutter et al., 2006; Uemura et al., 2004)

SNAREs en conformation ouverte. Il existe aussi le domaine PX présent chez Vam7p de *S. cerevisiae* qui interagit avec le phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) et induit son adressage à la vacuole (Cheever et al., 2001). Davantage de détails sur ces mécanismes sont disponibles dans les nombreuses revues issues des laboratoires de J.E. Rothman, R. Schekman, T. Südhof, R. Scheller et T. Söllner comme par exemple Malsam et al., 2008 et Südhof and Rothman, 2009.

Après fusion des membranes, le complexe SNARE reste formé et son désassemblage, nécessaire au recyclage des SNAREs, est effectué par une machinerie composée des protéines NSF (N-ethylmaleimide Sensitive Factor) et SNAP (Soluble NSF Attachment Protein). Trois protéines SNAP se fixent de manière longitudinale sur le complexe SNARE et le domaine N-terminal de NSF se lie au complexe SNAP-SNARE (Hanson et al., 1997b; Hohl et al., 1998). La protéine NSF est une ATPase et l'hydrolyse de l'ATP, stimulée par les SNAPs, va permettre de fournir suffisamment d'énergie pour séparer les protéines du complexe (Mayer et al., 1996; Söllner et al., 1993b).

Le génome d'*A. thaliana* code pour un grand nombre de SNAREs (62) (Table II) comparé au génome d'*Homo sapiens* (35) ou de *S. cerevisiae* (24) (Burri and Lithgow, 2004). Ces différentes SNAREs sont réparties sur l'ensemble des membranes de la cellule sauf celles des mitochondries et des plastes (dont l'origine est endosymbiotique) (Fig. I-16).

Chez *A. thaliana*, 21 SNAREs ont été localisées à l'interface entre le RE et l'appareil de Golgi (Table II) par des études bioinformatiques et des observations microscopiques (Bubeck et al., 2008; Chatre et al., 2005; Sanderfoot, 2007; Uemura et al., 2004). Les Qa-SNAREs Syp31 et Syp81 ont été montrées comme intervenant dans le transport au niveau de cette interface (Bubeck et al., 2008) et chez *S. cerevisiae*, l'orthologue de Syp31 (Sed5p) interagit avec les orthologues de la Qc-SNARE Sec221 (Sec22p) et de la Qb-SNARE Memb11 (Bos1p) (Tsui et al., 2001). La R-SNARE du complexe chez la levure serait Bet1p. Une implication de Memb11 et de Sec221 dans le transport à cette interface est aussi observée car lorsque ces deux protéines sont surexprimées dans les cellules de l'épiderme de Tabac cela entraîne la redistribution des protéines de l'appareil de Golgi dans le RE (Chatre et al., 2005).

Chez la levure, Sec22p a été identifiée comme étant nécessaire aussi bien pour le transport antérograde que rétrograde (Parlati et al., 2002; Spang and Schekman, 1998).

Cependant chez *A. thaliana* nous ne savons toujours pas exactement quels sont les complexes permettant chaque transport.

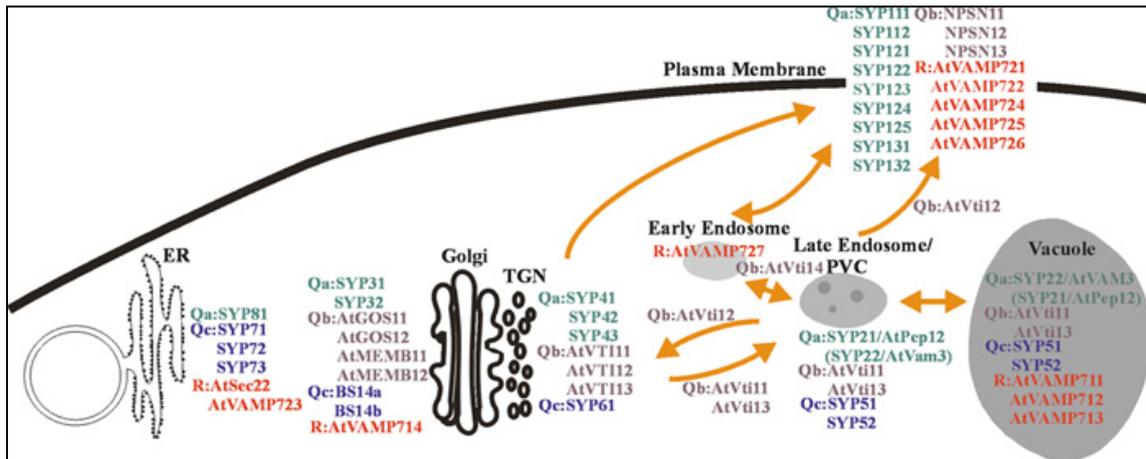


Figure I-16 : Localisation des différentes SNAREs au sein des cellules d'*A. thaliana*. Bs14a et Bs14b correspondent respectivement à Bet11 et Bet12. (d'après Uemura et al., 2004).

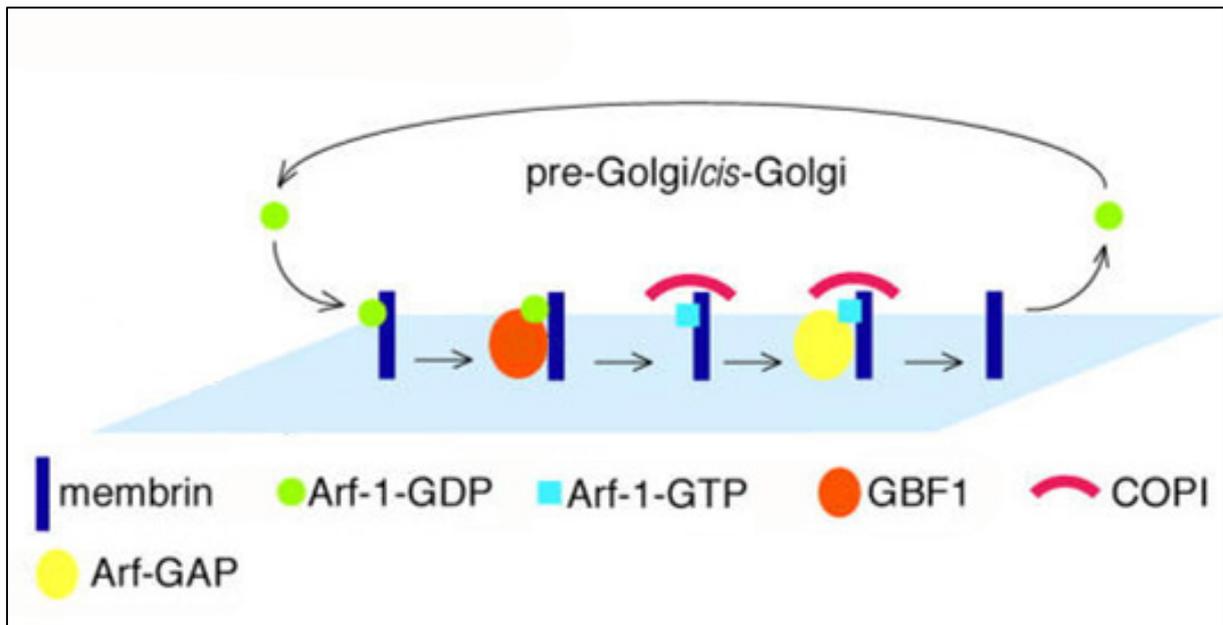


Figure I-17 : Modèle de Honda et al. pour le recrutement d'Arf1 à la membrane du *cis*-Golgi par la SNARE Membrine. Membrine recrute Arf1-GDP à la membrane puis Arf1-GDP est activée par l'Arf-GEF Gbf1. Arf1-GTP peut alors recruter les protéines du manteau COPI, des effecteurs et l'Arf-GAP qui va permettre l'hydrolyse du GTP. Arf1-GDP est ensuite libérée dans le cytosol (Honda et al., 2005).

I.3.D En résumé ...

Environ 1/3 des protéines d'une cellule transitent par la voie sécrétoire. Le parcours commence au sein du Réticulum Endoplasmique où de nombreuses protéines vont être synthétisées ou transloquées puis subiront des événements de maturation (repliement, ajout d'oligosaccharides, ...). Ces protéines doivent ensuite rejoindre la seconde étape : l'appareil de Golgi où de nouvelles modifications leurs seront apportées. Ce passage nécessite un transport vésiculaire et implique plusieurs machineries. Le transport entre ces deux organites est bidirectionnel car certaines protéines doivent retourner dans le Réticulum Endoplasmique après avoir subi des modifications dans l'appareil de Golgi.

Le transport vésiculaire se fait en différentes étapes, premièrement les protéines sont recrutées au sein de vésicules naissantes. Ce bourgeonnement est induit par la machinerie COPII avec la GTPase Sar1 pour le transport antérograde et par la machinerie COPI avec la GTPase **Arf1** pour le transport rétrograde. Ensuite les vésicules sont arrimées à la membrane cible par l'action de Rab-GTPases et de facteurs d'arrimage : p115 et le complexe TRAPPI pour le transport antérograde et le complexe de type Dsl1 pour le transport rétrograde. Et pour finir, la fusion des membranes (membrane de la vésicule et membrane de l'organite ciblé) est permise par l'action des protéines **SNARE**.

I.4 Présentation du sujet de thèse.

Lors de ma thèse je me suis intéressée au recrutement d'Arf1 à la membrane *cis*-golgienne chez *A. thaliana* car c'était un processus encore incompris.

En 2005, Honda et al. ont émis l'hypothèse que chez les mammifères, la SNARE Membrane du transport antérograde présente sur la membrane *cis*-golgienne serait le « récepteur » d'arf1 dans la mesure où ces deux protéines interagissaient. Cette interaction avait été montrée comme dépendante de la présence d'un motif MXXE sur la séquence peptidique d'Arf1. Ils avaient alors établi le modèle suivant lequel Arf1-GDP est recruté à la membrane *cis*-golgienne par Membrane puis Arf1-GDP recrute sa GEF qui l'active en Arf1-GTP. Son activation induit son ancrage à la membrane puis le schéma classique de formation de la vésicule COPI est suivi (Fig. I-17). Par la suite aucune autre étude n'a été réalisée pour déterminer le rôle exact de Membrane dans le recrutement d'arf1. En 2008, Matheson et al., a mis en évidence chez

A. thaliana l'importance du motif MXXE d'Arf1 pour son recrutement à la membrane *cis*-golgienne et a émis l'hypothèse que Memb11, l'orthologue de la protéine Membrine animale, pourrait être le « récepteur ».

Cependant chez *A. thaliana* il existe deux orthologues de Membrine : Memb11 et Memb12. Je me suis donc demandée si les deux protéines pouvaient interagir avec Arf1 et si l'une ou l'autre était le « récepteur » lui permettant de s'ancrer à la membrane *cis*-golgienne.

Le Laboratoire de Biogenèse Membranaire possédant déjà certains outils (anticorps, protéine marquée avec des fluorophores) pour l'étude de la protéine Memb11, il nous a paru intéressant d'étudier l'interaction « Arf1-Membrine » en se focalisant sur Memb11 et Memb12 plutôt que sur Arf1.

Pour cela j'ai réalisé le programme de recherches suivant (par cohérence, toutes les expériences réalisées au cours de ma thèse ont été effectuées chez *A. thaliana*) :

- Etude de la famille des Membrines chez les végétaux
- Vérification de la spécificité de l'anticorps existant au laboratoire
- Etude de la localisation subcellulaire de Memb11 par immunolocalisation en Microscopie électronique à transmission sur des racines
- Recherche de partenaires de Memb11/Memb12 par approche IP (immunoprécipitations)
- Mise en évidence de l'interaction Memb11-Arf1 *in vivo* par BiFC et de sa localisation subcellulaire au niveau de l'appareil de Golgi
- Démonstration de la spécificité d'interaction d'Arf1 avec Memb11 mais pas Memb12
- Etude des différences structurales potentielles des deux protéines Memb11 et Memb12 par approche bio-informatique *in silico* pour identifier des séquences/domaines d'intérêt pour l'interaction avec Arf1. « Design » de constructions mutées.
- Caractérisation préliminaire *in vivo* par BiFC de l'implication de ces séquences/domaines de Memb11 pour l'interaction avec Arf1.

II RESULTATS

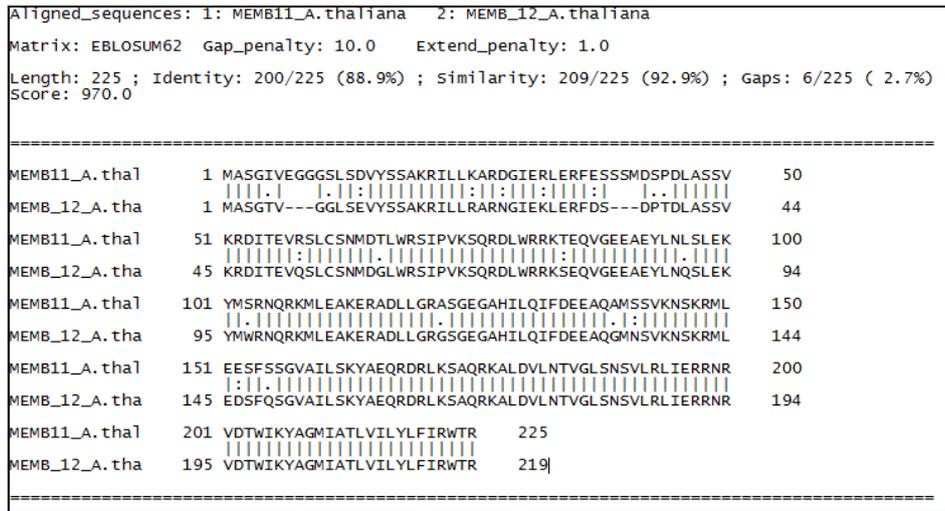


Figure II-1 : Alignement global suivant l'algorithme de Needleman et Wunsch de Memb11 et Memb12.

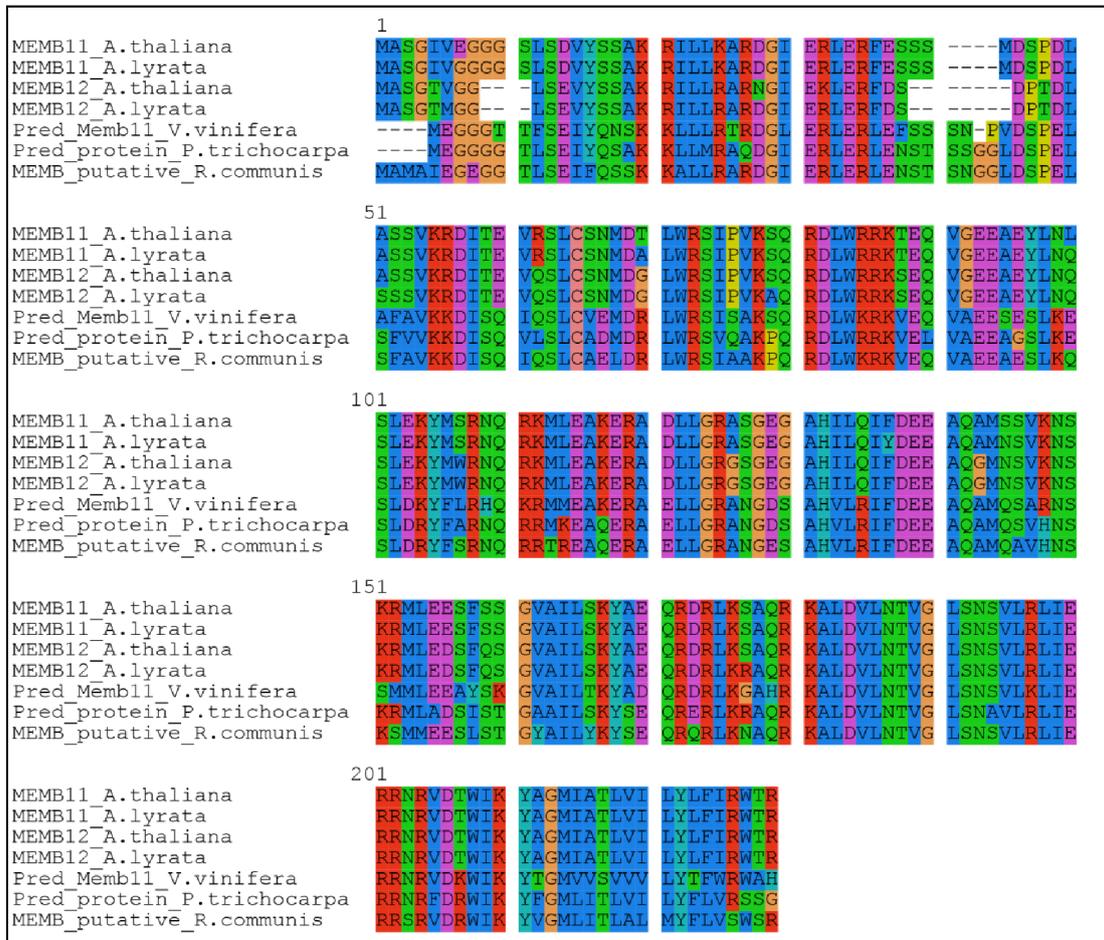


Figure II-2 : Alignement multiple avec le logiciel Muscle des séquences nucléotidiques des différentes Membrines ayant permis la création de l'arbre phylogénétique.

II.1 Etude de la famille des Membrines, obtention et caractérisation d'un anticorps et recherche de partenaires

II.1.A Présentation de la famille des Membrines dans différentes espèces végétales

Chez *Arabidopsis thaliana*, Memb11 (At2g36900) est l'homologue de la protéine Membrane animale. La question s'impose donc de savoir si Memb11 pourrait interagir avec Arf1 et avoir un rôle de « récepteur » de cette protéine comme cela est le cas chez les mammifères (Honda *et al.*, 2005).

Tout d'abord, chez *A. thaliana* il existe deux homologues de Membrane : Memb11 (At2g36900) et Memb12 (At5g50440) possédant 92.9% de similarité de séquence protéique d'après l'alignement de séquence global (Fig. II-1) que j'ai réalisé avec l'algorithme de Needleman et Wunsch (<http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::needle>).

Afin d'essayer de comprendre cette duplication, j'ai créé un arbre phylogénétique à partir de séquences peptidiques de différentes plantes dont le génome a été entièrement séquencé. Il a tout d'abord fallu faire une recherche par alignement avec Blastp en mettant comme restriction « green plants ». Puis je n'ai gardé que les protéines ayant une identité de séquence avec Memb11 supérieure à 30% et un recouvrement de séquence minimum de 80%. Pour les séquences obtenues, chaque organisme a été recherché sur GOLD afin de savoir si le séquençage de son génome est complet. C'est ainsi que j'ai sélectionné sept séquences:

- Membrin putative;*Ricinus communis* :XP_002525701.1
- Predicted protein;*Populus trichocarpa* : XP_002319183.1
- Memb11predicted;*Vitis vinifera* :XP_002275569.1
- Memb12;*Arabidopsis thaliana* :NP_199855.1
- Memb12;*Arabidopsis lyrata* :XP_002865806.1
- Memb11;*Arabidopsis thaliana* :NP_181227.1
- Memb11;*Arabidopsis lyrata* :XP_002881481.1

Pour la création de l'arbre phylogénétique, j'ai utilisé le logiciel Seaview 4. L'alignement multiple a été réalisé avec Muscle (Fig. II-2) puis l'arbre avec PhyML (Fig. II-3).

L'alignement montre une très forte conservation du domaine C terminal chez toutes les Membrines mais aussi en N-terminal pour Memb11 et Memb12 d'*A. thaliana* et *lyrata*.

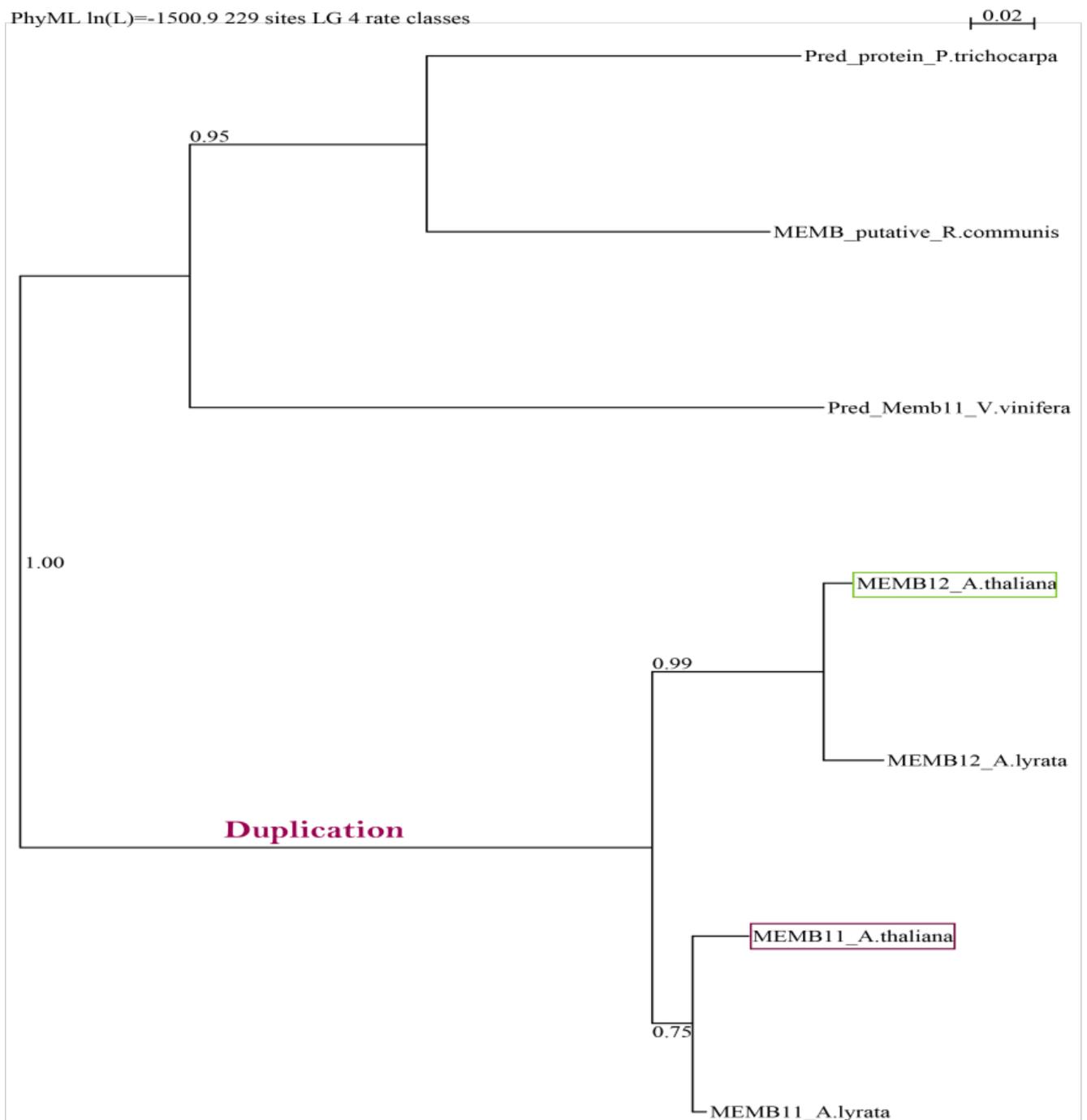


Figure II-3 : Arbre phylogénétique des différentes Membrines obtenu avec le logiciel PhyML.

Cet alignement de séquence a permis d'élaborer l'arbre phylogénétique de Memb11. L'arbre obtenu est très robuste car les « bootstraps » à chaque embranchement sont proches de 1 (de 0.75 à 1). Cela signifie que la construction de cet arbre n'est pas due au hasard. Nous pouvons observer que Memb11 et Memb12 sont présentes uniquement chez les deux espèces d'*Arabidopsis* : *thaliana* et *lyrata* et que Memb12 provient d'un évènement de duplication qui a été suivi d'une spéciation. Cependant il est impossible d'exclure le fait que cette protéine puisse être présente chez d'autres espèces proches des arabettes car tous les génomes ne sont pas entièrement séquencés.

II.1.B Obtention et caractérisation d'un anticorps anti-Memb11

II.1.B.a Obtention et caractérisation préliminaire de l'anticorps

Avant mon arrivée (thèse de Laurent Chatre), la protéine recombinante de Memb11 a été obtenue afin de permettre la production d'un anticorps. Pour cela une collaboration avec Agnès Hocquelllet, Majid Noubhani et Xavier Santarelli du groupe « production et purification de protéines recombinantes » de l'ENSTBB (Université Bordeaux Segalen) avait été menée. Après différents essais de production, il en était ressorti que seule la protéine sans son domaine transmembranaire pouvait être produite en quantité suffisante. Le clonage de la séquence codante a été réalisé dans le vecteur pET15b (Novagen) entre les sites NdeI et BamHI. La production a ensuite été réalisée dans des fermenteurs avec des bactéries *E. coli* C41 de chez Avidis (mutants de BL21 produisant des corps d'inclusion qui permettent de stocker de fortes concentrations de protéines hydrophobes, et donc conduisant à une meilleure production de ces protéines (Miroux et Walker (1996)). Ce vecteur ajoute une étiquette [His]6 en C-terminal de la protéine, ce qui permet leur purification sur des colonnes de nickel. Un traitement de ces protéines recombinantes a ensuite été effectué afin d'éliminer l'étiquette [His]6 par clivage protéolytique avec la thrombine (au niveau du site de clivage présent entre la protéine et l'étiquette). La production d'anticorps polyclonaux a ensuite été confiée à la société Covalab.

Des anticorps polyclonaux anti-Memb11 ont ainsi été obtenus et ont été testés par Western Blot sur des homogénats d'*Arabidopsis thaliana* de 14 jours. Comme observé sur la Fig. II-4, l'anticorps ne révèle qu'une seule bande à un poids moléculaire légèrement plus élevé que le poids théorique (25KDa). Nous sommes toutefois certains que l'anticorps a reconnu Memb11

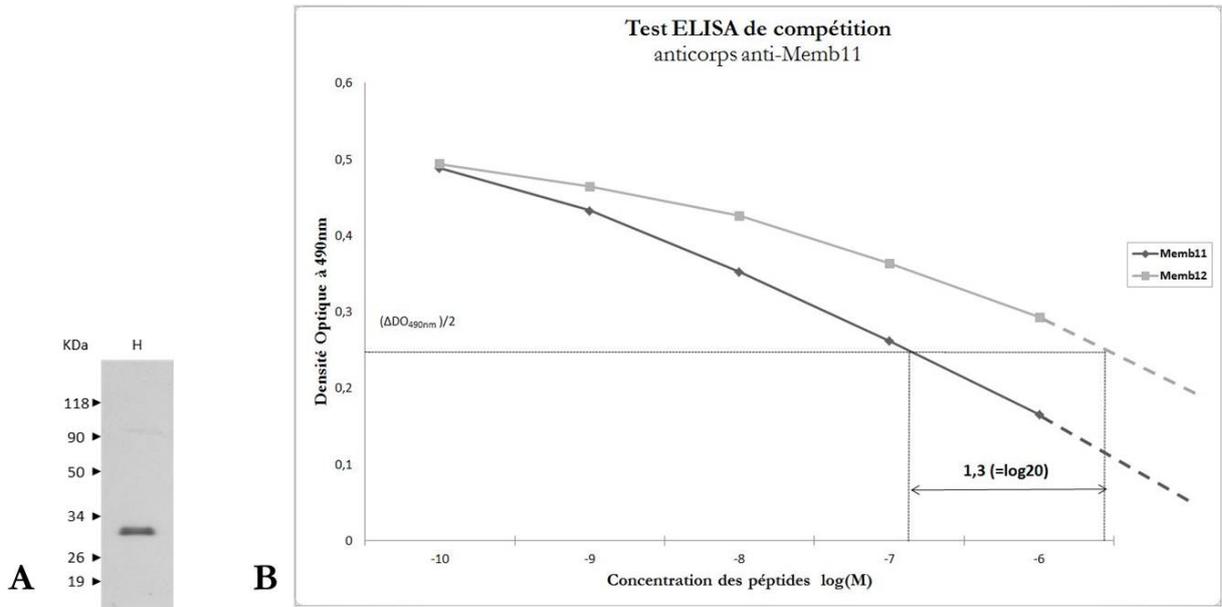


Figure II-4 : Test de l'anti-Memb11. (A) Western blot avec l'anti-Memb11 sur un homogénat (H) d'*A. thaliana* Col0. (B) Test ELISA par compétition afin de vérifier la spécificité de l'anticorps sur des peptides de Memb11 et de Memb12.

car la bande a été analysée par des études de spectrométrie de masse et Memb11 est retrouvée à ce niveau. La différence de migration observée est donc sûrement due à la conformation tridimensionnelle de la protéine.

L'anticorps reconnaît effectivement la protéine Memb11 mais Memb12 ayant presque 93% de similarité, est peut être aussi reconnue par l'anticorps. De plus ayant la même taille, Memb12 a aussi été retrouvée dans les analyses par spectrométrie de masse. Pour tester si l'anticorps reconnaît les deux protéines nous avons réalisé un test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) à partir de peptides purifiés de Memb11 et de Memb12.

Puisque la production de Memb11 n'avait été possible que sous sa forme tronquée sans le domaine transmembranaire, j'ai décidé de produire pour Memb11 et Memb12 ces mêmes peptides. Je les ai obtenus par expression *in vitro* avec les enzymes d'*Escherichia coli* et la T7 polymérase. Ces productions ont été réalisées avec l'aide de Marie-France Giraud de l'IBGC (Université Bordeaux Segalen/CNRS). Les gènes ont été clonés dans le vecteur pIVEX2.3 de chez Roche. C'est un vecteur du système RTS (Rapide Translation System) qui permet la production de protéines avec une étiquette 6[His]. L'étiquette est positionnée en C-terminal de la protéine, ainsi seules les protéines provenant d'une étape de transcription et de traduction complètes seront purifiées. J'ai obtenu des peptides de Memb11 et de Memb12 afin de réaliser le test ELISA pour connaître la spécificité de notre anticorps anti-Memb11.

Le test ELISA par compétition a été réalisé avec les peptides (une série avec Memb11 et une série avec Memb12) pré-incubés avec une concentration fixe d'anticorps anti-Memb11; les 2 séries ont été ensuite déposées sur la plaque recouverte de Memb11. Plus l'anticorps reconnaît l'antigène, plus il y aura de complexes anticorps-antigène lors de la pré-incubation et donc moins il restera d'anticorps libres pour se fixer sur la plaque et par conséquent plus la densité optique (DO) mesurée à la fin du test sera faible.

Sur le graphique nous pouvons observer que la courbe de Memb11 chute plus rapidement que celle de Memb12. Généralement on compare les concentrations à la valeur de DO_{490nm} médiane. Bien que la courbe de Memb12 n'atteigne pas cette valeur on pourrait l'extrapoler (courbe en pointillés) et dans ce cas une différence d'un facteur d'environ 20 est observée avec la courbe de Memb11. Donc l'anticorps reconnaît dix à vingt fois plus le peptide de Memb11 que celui de Memb12.

Pour conclure nous pouvons dire que l'anti-Memb11 est fonctionnel sur les protéines dénaturées et sur les peptides mais qu'il reconnaît également Memb12 (environ vingt fois moins

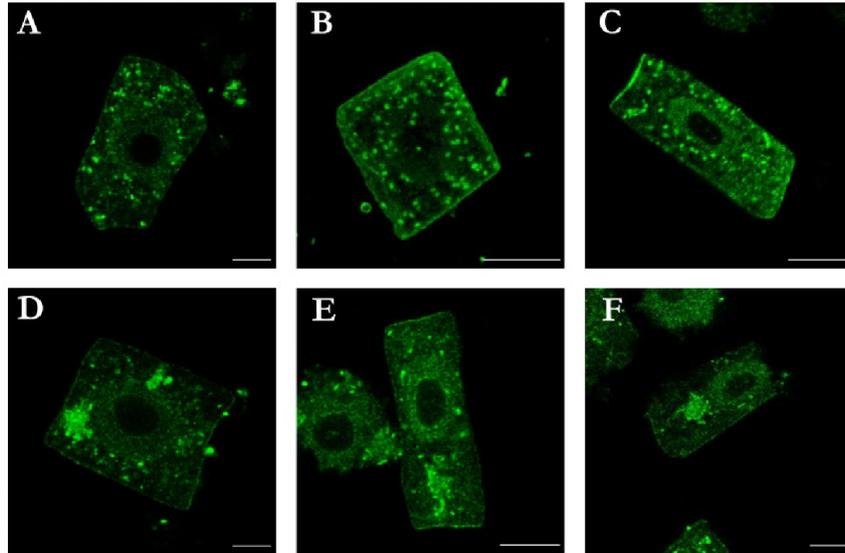


Figure II-5 : Immunolocalisations réalisées avec l'anti-Memb11 sur des cellules de racines de maïs. Les cellules des images A, B et C présentent des ponctuations fluorescentes. Les cellules des images D, E et F ont été traitées à la BFA avant l'immunolocalisation. Des corps BFA y sont observés. Les barres d'échelle correspondent à 10µm.

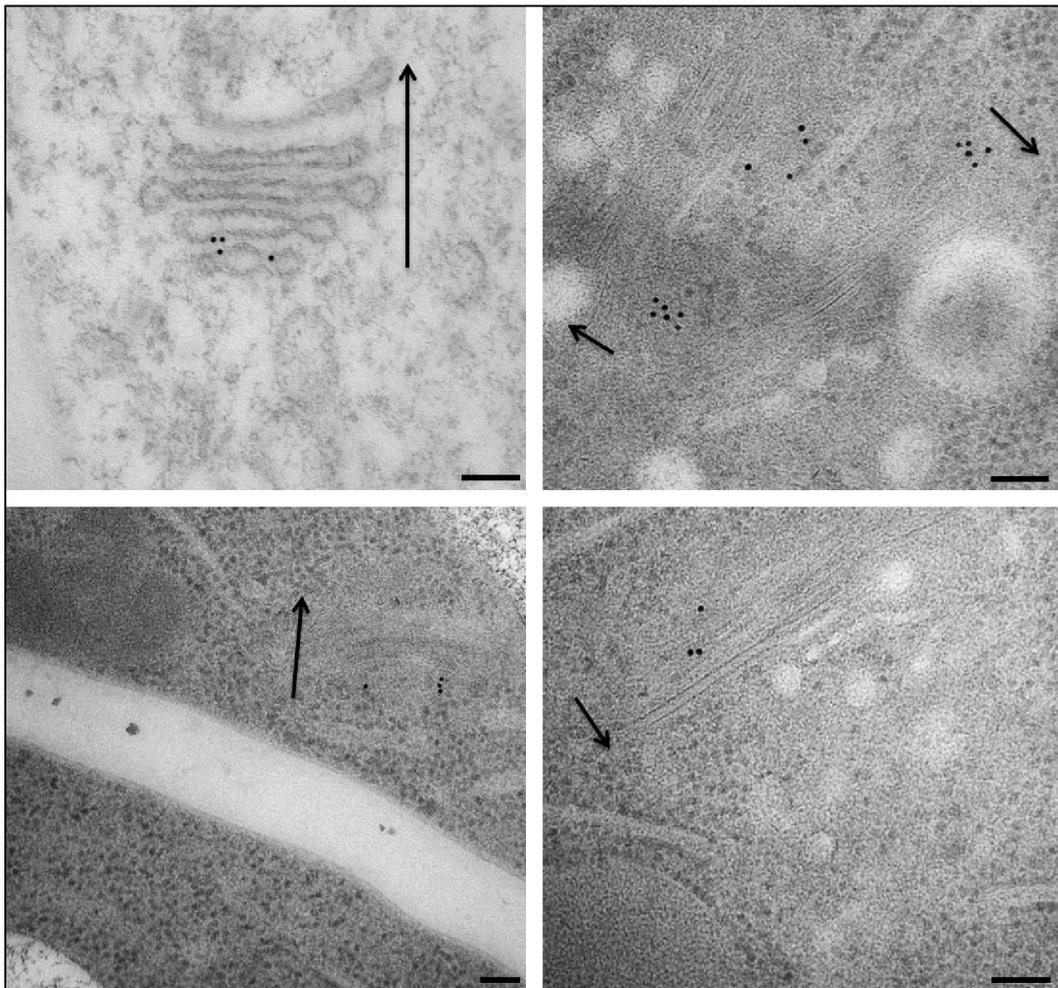


Figure II-6 : Clichés d'immunolocalisation avec l'anti-Memb11 en microscopie électronique à transmission. Les flèches noires représentent l'orientation du dictyosome golgien, du saccule *cis* vers la *trans*. La barre d'échelle correspond à 100nm.

que Memb11). Il faudra tenir compte de cela lors des expériences menées avec cet anticorps : Western Blots, Immunoprécipitations et Immunolocalisations.

II.1.B.b Immunolocalisation de Memb11/Memb12 observée par microscopie électronique à transmission (MET)

Sachant que l'anticorps reconnaît les protéines linéarisées, lors de la thèse de Laurent Chatre, l'anticorps anti-Memb11 avait été testé sur des protéines dans leurs conformations natives lors d'études d'immunolocalisation sur des cellules de racines de maïs. Ce travail avait été réalisé par Béatrice Satiat-Jeunemaitre (ISV, Gif-sur-Yvette) et montrait que l'anticorps marquait des structures ponctuées au sein des cellules (Fig. II-5a-c). Des tests avec la drogue Bréfeldine A (BFA) avaient aussi été effectués. Cette substance est un inhibiteur de certaines Arf-GEF et induit une désorganisation de l'appareil de Golgi. Les tests avaient montré la redistribution de la fluorescence en corps BFA ce qui suggérait une localisation de Memb11/Memb12 dans l'appareil de Golgi (Fig. II-5d-f).

Afin de connaître la localisation précise chez *A. thaliana*, j'ai réalisé des études d'immunolocalisation par MET avec l'aide de Lysiane Brocard et Brigitte Batailler du Pôle Imagerie Végétale du BIC (Bordeaux Imaging Center). Ces expériences ont été réalisées sur les apex racinaires de plantules de 10 jours cryofixées, contrastées avec de l'acétate d'uranyle puis inclus dans de la résine HM20. Ce protocole utilise la cryofixation puis la cryosubstitution et permet donc de préserver au mieux l'intégrité ultra-structurale des membranes.

L'immunomarquage a été réalisé avec l'anti-Memb11 et des anticorps secondaires couplés à des billes d'or de 10 nm. Nous pouvons observer les billes d'or au niveau de l'appareil de Golgi sur les différents clichés de MET (Fig. II-6) et plus particulièrement au niveau des membranes *cis*-golgiennes (membranes plus épaisses et saccules plus petits).

Nous pouvons alors dire que Memb11 et/ou Memb12 sont localisées principalement au niveau des membranes *cis*-golgiennes dans les cellules de l'apex racinaire d'*A. thaliana*.

Cependant, en regardant le taux de transcrite des gènes codant pour Memb11 et pour Memb12 sur le logiciel en ligne Genevestigator, nous pouvons voir que Memb11 et Memb12 sont transcrits de manière ubiquitaire dans les différents organes d'*Arabidopsis thaliana* (II-Fig. 7) mais Memb11 est transcrit de façon élevée alors que Memb12 ne l'est que faiblement. Cependant,

Dataset: 126 anatomical parts

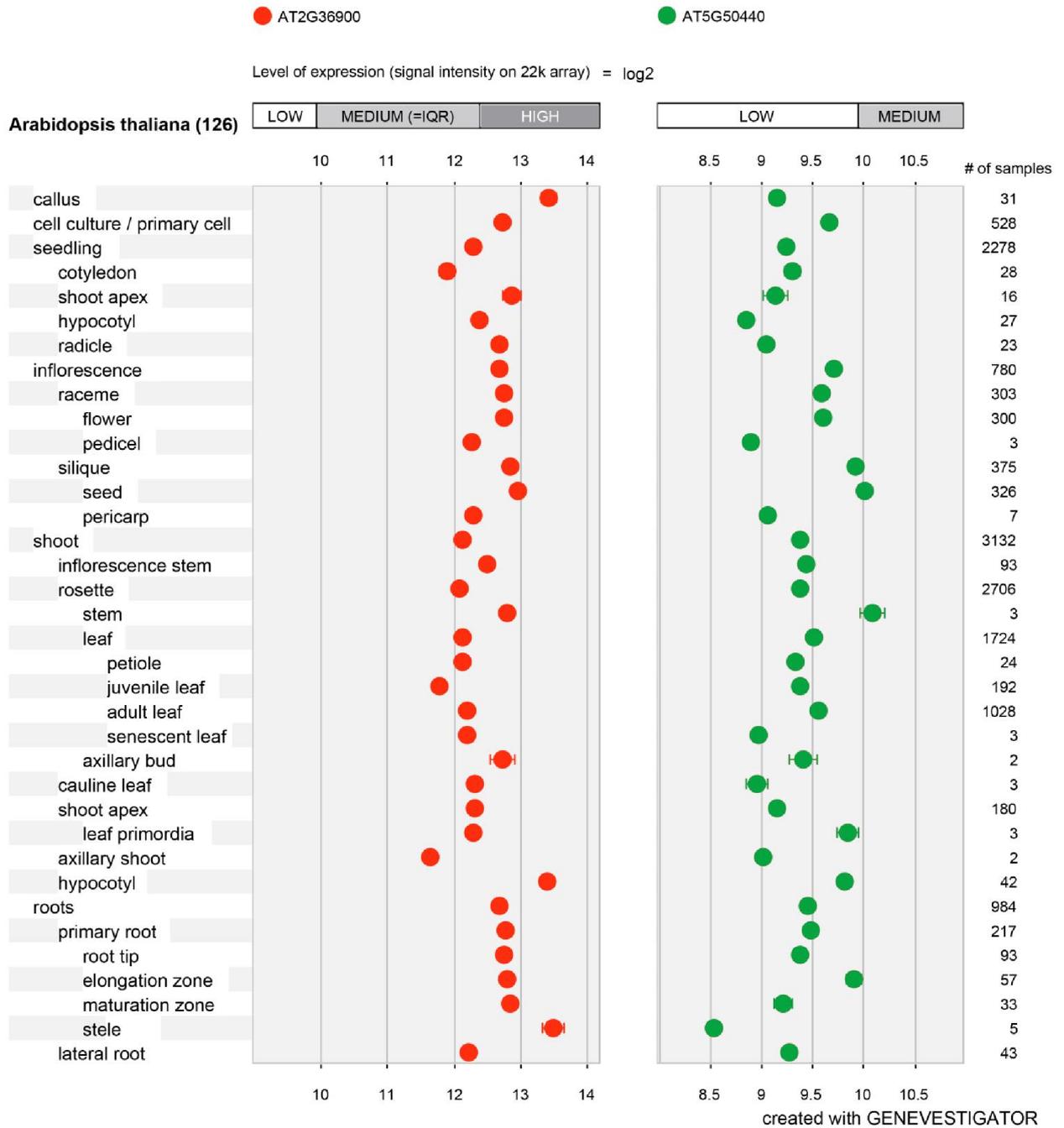


Figure II-7 : Comparaison des taux de transcrit de Memb11 et Memb12 à partir de Genevestigator. En rouge sont représentés les taux de transcrits de Memb11 (At2g36900) et en vert ceux de Memb12 (At5g50440). Les diagrammes ont été modifiés avec le logiciel Photoshop pour une meilleure comparaison.

il est vrai que ce taux ne reflète pas la quantité de protéines exprimées mais cela nous donne tout de même une indication sur la production potentielle de la protéine.

Pour conclure, en vue de la différence de spécificité de l'anticorps et des données de transcriptomique, nous pouvons estimer que c'est Memb11 et non Memb12 qui est reconnue par les anticorps lors de l'immunomarquage. Memb11 est donc localisée au niveau de la membrane *cis*-golgienne dans les cellules de la racine d'*A. thaliana*.

II.2 Recherche de partenaires de Memb11 et Memb12 par immunoprécipitation

Afin de rechercher des partenaires protéiques de Memb11 et/ou de Memb12, des immunoprécipitations (IP) ont été réalisées avec l'anticorps anti-Memb11.

Des anticorps purifiés à partir de divers sérums de lapin non immuns ont été utilisés comme contrôles négatifs des IP. J'ai effectué 18 IP avec l'anticorps anti-Memb11 et 10 IP dites « contrôle négatif » à partir de plantules d'*A. thaliana* de l'écotype Col0 âgées de 14 jours. Le volume des échantillons obtenus a été partagé en deux et une moitié été déposée sur gel de polyacrylamide 12% afin de réaliser un Western-blot. Lorsque la révélation est réalisée avec l'anti-Memb11 (Fig. II-8a), une bande à environ 30kDa est observée dans la piste correspondant à l'homogénat de plantules avant l'IP et aussi dans l'échantillon de l'IP. De plus pour le contrôle négatif, aucune bande n'est observée donc cela prouve que lors de l'IP l'anticorps a reconnu Memb11 (voire Memb12) dans l'homogénat.

L'autre moitié des échantillons est également déposée sur gel pour réaliser l'analyse des protéines par spectrométrie de masse. Cette étape d'analyse a été prise en charge par Jean-William Dupuis de la plateforme protéomique du CGFB (Université Bordeaux Segalen). Le système de détection et d'acquisition utilisé étant très sensible, de nombreux peptides sont identifiés dans les gels. L'identification des peptides observés est réalisée uniquement dans une banque de données protéiques d'*A. thaliana*. Les noms des peptides identifiés sont ensuite compilés dans des fichiers Excel. Lorsque j'ai analysé ces résultats (Fig. II-9), il en est ressorti que Memb11 était toujours présente lors des IP avec son anticorps et que Memb12 était observée dans 94% des cas. Par contre dans les IP « contrôle négatif », Memb11 et Memb12 ne sont jamais retrouvées. Ceci est en accord avec les observations réalisées par Western-blot. De plus, cela nous prouve aussi que

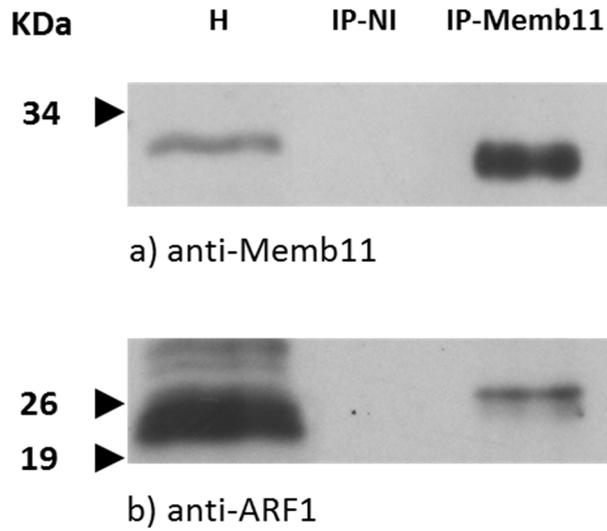


Figure II-8 : Western-blot représentatif des IP anti-Memb11 (IP-Memb11) et "contrôle négatif" (IP-NI) avec l'anti-Memb11 et l'anti-Arf1. H correspond à un homogénat de plantules d'*A. thaliana* ColO. a) révélation avec l'anticorps anti-Memb11, b) révélation avec l'anti-Arf1.

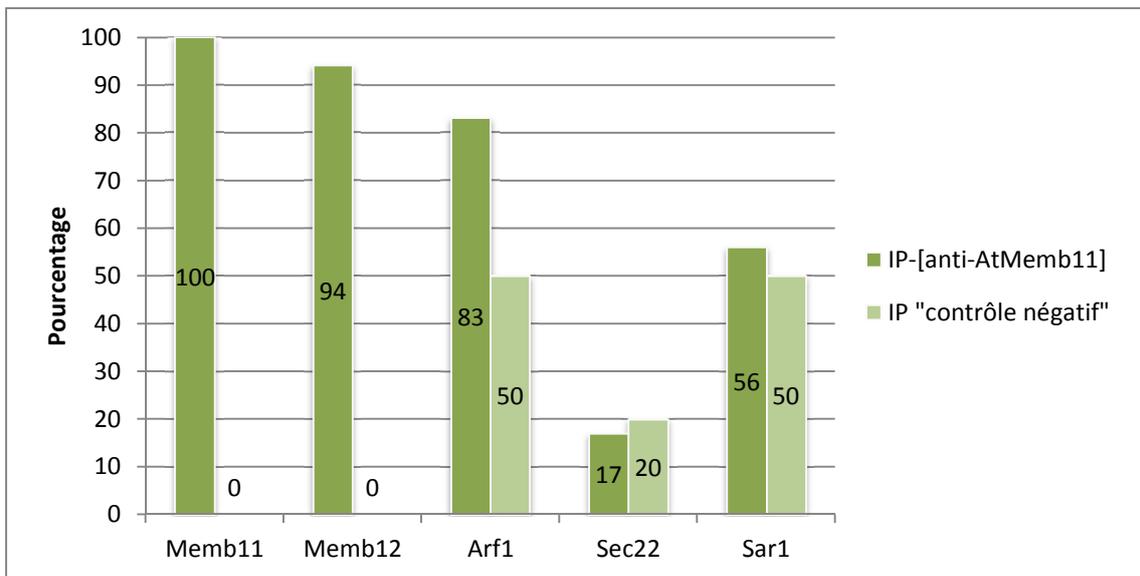


Figure II-9 : Représentation de la fréquence d'observation des peptides des protéines Memb11, Memb12 et Arf1 lors des différentes IP.

notre anticorps est capable de reconnaître Memb11 et Memb12 sous leurs formes dénaturées (Western-blot) mais aussi natives (IP).

Les résultats montrent aussi la présence des différentes isoformes d'Arf1 dans 80% des IP-[anti-Memb11]. Cependant elles sont aussi présentes dans les IP « contrôle négatif » mais dans une proportion moindre (50% des IP) (Fig. II-9). Il est impossible de savoir exactement quelle est l'isoforme réellement co-précipitée car les analyses de spectrométrie de masse identifient seulement des peptides, et ceux analysés pour Arf1 ne permettent pas de discriminer certaines isoformes (les protéines possèdent 98 à 99% d'identités). Les Western-blots sont aussi réalisés avec l'anti-Arf1 et la ou les protéines Arf1 sont observées dans l'homogénat et fréquemment dans l'IP-[anti-Memb11] (Fig. II-8b) comme le suggèrent les analyses par spectrométrie de masse.

J'ai aussi observé la fréquence d'apparition d'autres protéines dans les IP telles que la SNARE Sec22, située à l'interface RE-appareil de Golgi comme Memb11 et Memb12, et la GTPase Sar1 impliquée dans le recrutement de la machinerie COPII au niveau du RE. Premièrement, la SNARE Sec22 est retrouvée faiblement et de façon équivalente dans l'IP-[anti-Memb11] et dans l'IP « contrôle négatif » (respectivement 17% et 20%). De même que Sar1, qui est présente de façon équivalente dans les deux types d'IP (respectivement 56% et 50%). Ces deux protéines sont de familles comparables aux protéines étudiées (Memb11, Memb12 pour Sec22 et Arf1 pour Sar1) et illustrent le fait que pour des protéines n'interagissant pas spécifiquement avec les anticorps ou avec la protéine Memb11 ou Memb12, il y a une fréquence basale d'interaction qui est la même quel que soit l'anticorps utilisé pour faire l'IP. Par conséquent, la différence de 33% observée pour Arf1 entre les deux IP est significative et suggère une co-immunoprécipitation entre Memb11/Memb12 et Arf1.

Pour conclure, étant donné que Memb11 et/ou Memb12 co-immunoprécipitent avec Arf1, il est raisonnable de proposer que l'une ou les deux Membrines pourraient interagir directement ou indirectement avec Arf1. Ceci serait en accord avec les observations de Honda *et al.* (2005) où ils montrent une interaction *in vitro* dans les cellules HeLa et une co-localisation de ces protéines dans les cellules NRK.

Afin de vérifier cette hypothèse et déterminer laquelle de Memb11 ou Memb12 interagit avec Arf1, j'ai réalisé des études d'interaction avec des tests de BiFC (**B**imolecular **F**luorescence **C**omplementation).

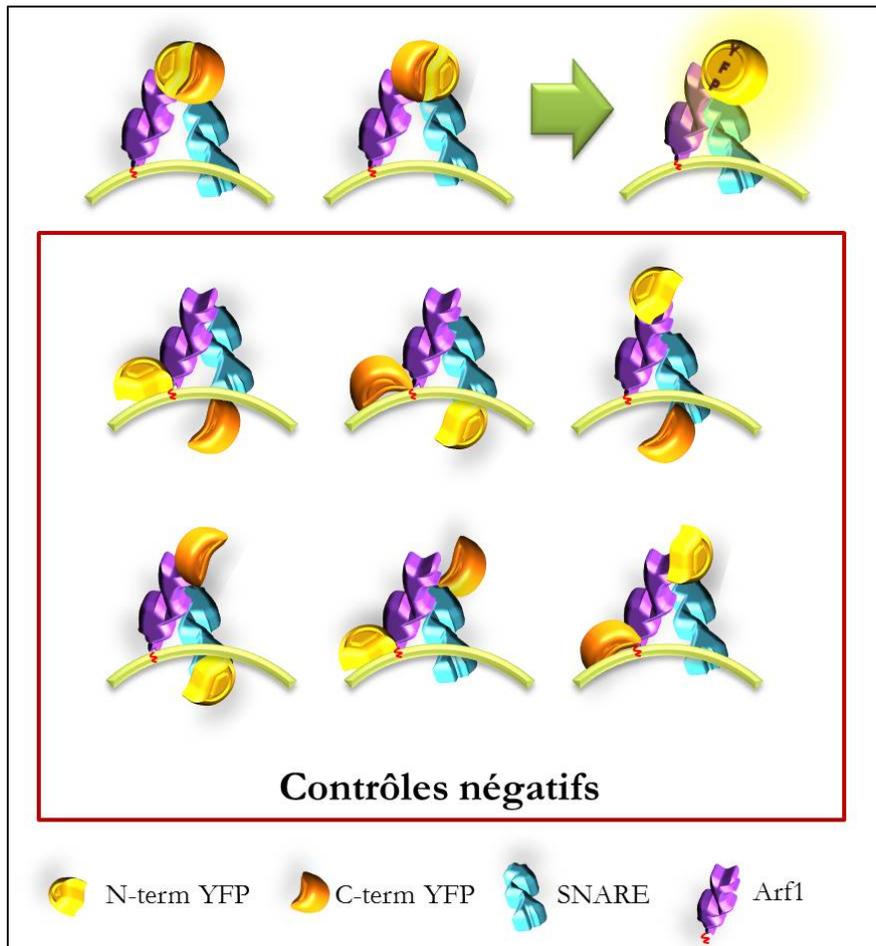


Figure II-10 : Représentation schématique des couples testés en BiFC. Pour chaque couple SNARE-Arf1, la moitié N- ou C-terminale de l'YFP est testée à chaque extrémité des protéines. Les SNAREs étant des protéines membranaires ancrées en C-terminal et Arf1 possédant une hélice amphipathique et une myristoylation à l'extrémité N-terminale seuls deux couples peuvent permettre de reformer l'YFP. Ce sont les couples où la moitié de l'YFP est du côté N-terminal de la protéine SNARE et du côté C-terminal d'Arf1. Les autres couples ont été testés et ont servi de contrôles négatifs.

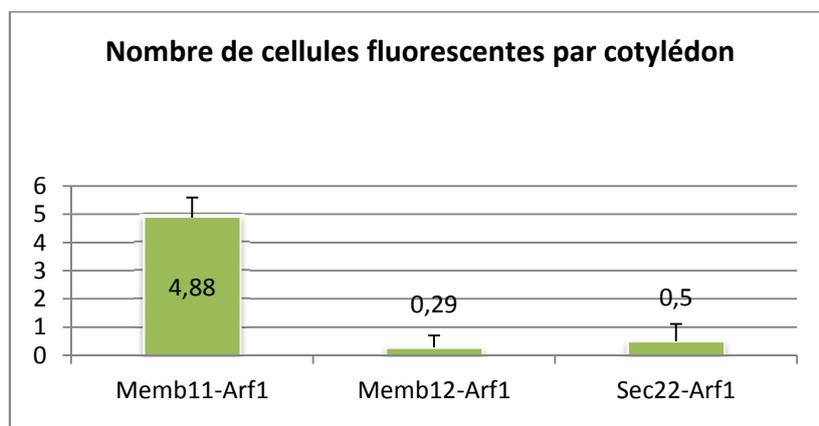


Figure II-11 : Graphique récapitulatif des expériences de BiFC entre les protéines SNAREs et Arf1. Est représentée la moyenne du nombre de cellules présentant des ponctuations fluorescentes d'une taille correspondant aux dictyosomes golgiens par cotylédon. Memb11-Arf1 (n=32), Memb12-Arf1 (n=28), Sec22-Arf1 (n=28).

II.3 Mise en évidence *in vivo* par approche BiFC de l'interaction Memb11/Memb12-Arf1

Afin de déterminer qui de Memb11 ou Memb12 interagit avec ARF1, j'ai décidé de réaliser des études de BiFC qui permettent aussi de localiser de façon subcellulaire l'interaction.

Le principe du BiFC est d'exprimer deux protéines d'intérêt avec une partie de la protéine YFP. Séparées, les deux parties ne fluorescent pas mais s'il s'avère qu'elles rentrent en contact ou qu'elles se rapprochent de moins de 10 nm elles peuvent reformer la protéine YFP et une émission de fluorescence est alors possible.

J'ai donc testé les SNAREs Memb11, Memb12 et Sec22 avec Arf1. Ces trois SNAREs possèdent un domaine transmembranaire au niveau C-terminal et seule l'extrémité N-terminale est cytosolique. C'est pourquoi j'ai fait exprimer la moitié de l'YFP en N-terminal de ces protéines. Arf1 quant à elle, étant associée à la membrane par son extrémité N-terminale, l'autre moitié de l'YFP a été ajoutée à son extrémité C-terminale (Fig. II-10).

Afin de réaliser des contrôles négatifs, j'ai fait également exprimer les moitiés de l'YFP à l'autre extrémité des différentes protéines.

J'ai obtenu les différentes constructions en clonant la partie codante des différentes protéines, avec ou sans le codon stop en fonction de la localisation de la partie de l'YFP, dans les vecteurs pBIFP1 à 4.

Des 6 isoformes d'Arf1 existantes chez *A. thaliana* j'ai décidé de cloner ArfA1c (Arf1A1c : AT2G47170) car c'est la protéine qui avait été utilisée dans les travaux de Lee et al. en 2002 pour montrer l'implication d'Arf1 dans le trafic intracellulaire.

Les constructions obtenues sont insérées chez *Agrobacterium tumefaciens*. Puis j'ai co-infiltré des cotylédons d'*Arabidopsis thaliana* d'écotype Col0 et j'ai observé 48h après la fluorescence au microscope confocal (Fig. II-11, II-12). Lorsqu'il y a interaction j'observe de nombreuses ponctuations mobiles (Fig. II-12 B-F) semblables à celles obtenues avec le marqueur de l'appareil de Golgi Erd2 (Fig. II-12 A). L'efficacité de transformation n'est pas très importante mais il est tout de même possible de comptabiliser jusqu'à dix cellules transformées et montrant une interaction, par cotylédon. J'ai synthétisé l'ensemble des résultats dans un graphique montrant la moyenne du nombre de cellules présentant des ponctuations fluorescentes (appareil de Golgi) par

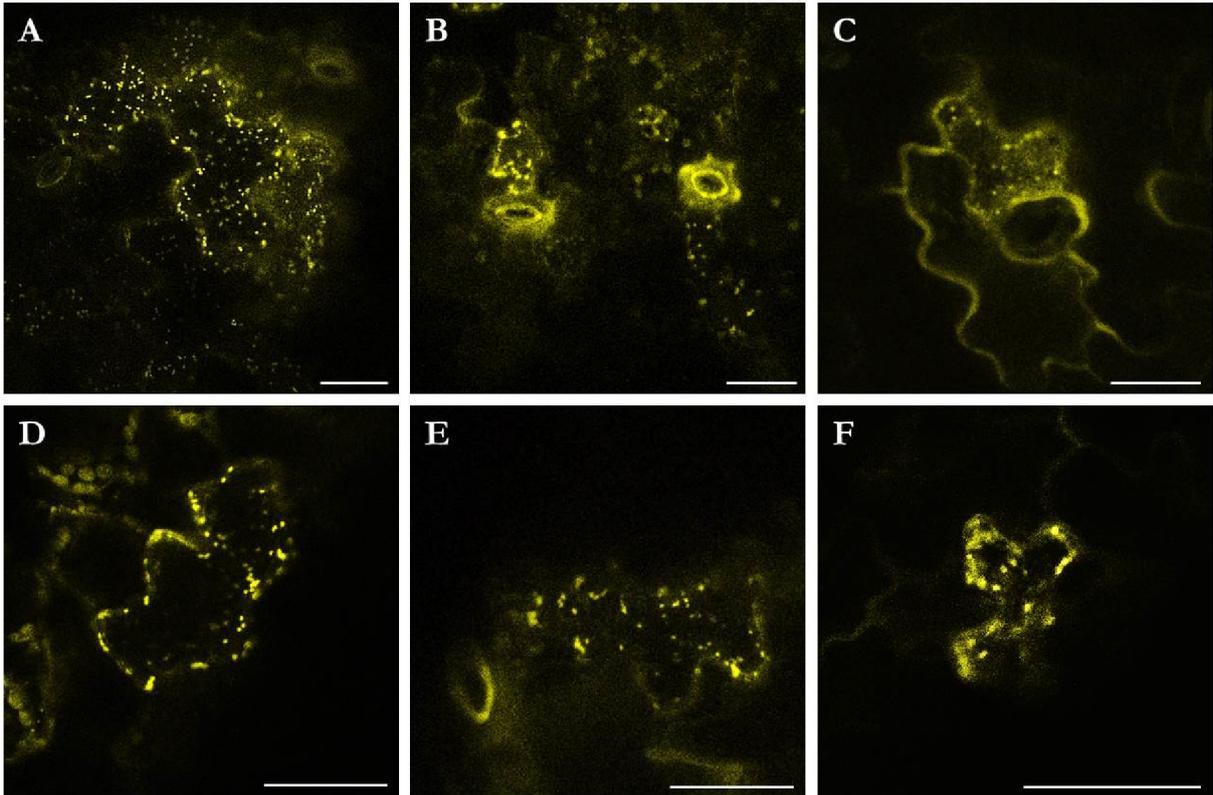


Figure II-12 : Images de microscopie confocale du marqueur golgien : Erd2-YFP (A) et des expériences de BiFC pour le couple Memb11-Arf1 (B, C, D, E et F). Les points observés pour les expériences de BiFC ont une taille semblable à ceux du marqueur. Erd2 est le récepteur membranaire des protéines devant être intégrées aux vésicules COPI (pour le retour au RE). La barre d'échelle correspond à 15µm.

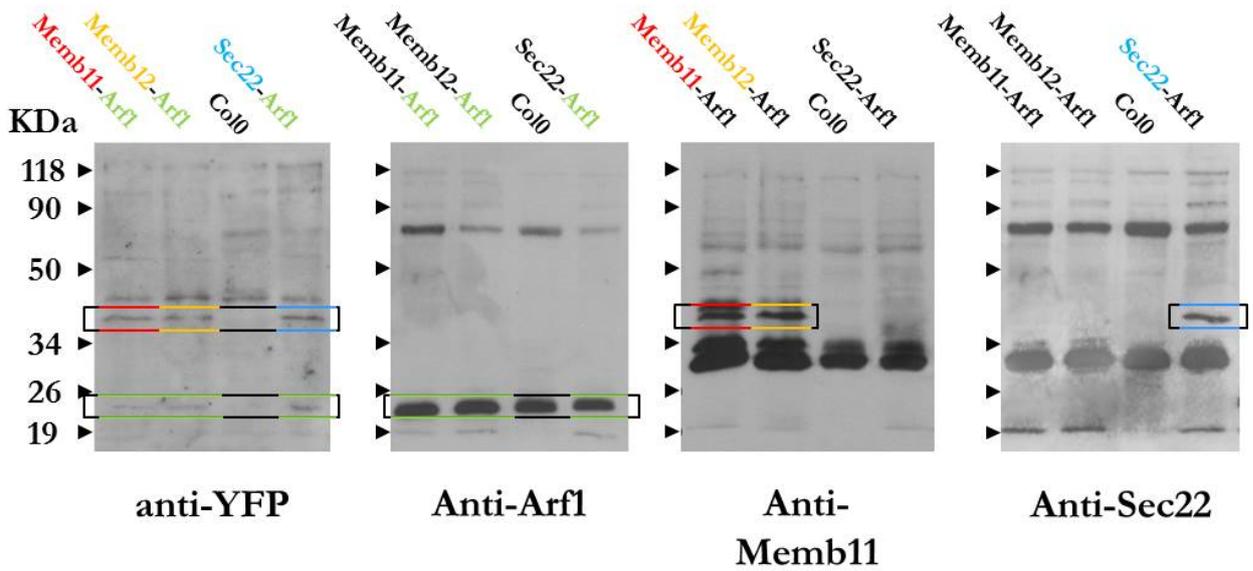


Figure II-13 : Western-blots pour la vérification de la production des protéines étiquetées lors des tests de BiFC. Anti-YFP : anti-GFP reconnaissant l'YFP.

cotylédon (Fig. II-11). Le couple Memb11-Arf1 permet d'obtenir un nombre moyen de cellules fluorescentes de 4,88 alors que les deux autres couples Memb12-Arf1 et Sec22-Arf1 ont un nombre de cellules fluorescentes proche de zéro (respectivement 0,5 et 0,29). Cela nous suggère fortement que l'interaction avec Arf1 est plutôt spécifique de Memb11.

J'ai testé les différentes parties de l'YFP au niveau des mêmes extrémités et j'obtiens des résultats similaires. Pour ce qui est des contrôles négatifs, ils me donnent tous des résultats négatifs sans émission de fluorescence.

Pour vérifier la présence des protéines dans les cotylédons, j'ai réalisé des Western-blots avec l'anti-Memb11, l'anti-Arf1, l'anti-Sec22 et l'anti-GFP sur les homogénats des cotylédons transformés (Fig. II-13). Avec l'anti-Memb11, deux bandes sont visibles pour Memb11 et Memb12, l'une correspondant à la forme endogène de la protéine à environ 30KDa et l'autre, plus faible, à la forme étiquetée avec la moitié C-ter de l'YFP à 40KDa. Puis lorsque nous utilisons l'anti-YFP, les bandes à 40KDa sont observées donc nous pouvons dire que Memb11-C-ter-YFP et Memb12-C-ter-YFP sont bien exprimées lors des expériences de BiFC. Pour ce qui est de Sec22, deux bandes sont observées avec l'anti-Sec22, et comme pour les Membrines, l'une correspond à la protéine endogène et l'autre à la protéine étiquetée. Par contre en ce qui concerne Arf1-N-ter-YFP, l'anti-Arf1 ne reconnaît qu'une seule bande à 20KDa mais lorsque l'anti-YFP est utilisé nous pouvons remarquer que c'est une bande à la même taille que la protéine endogène qui est marquée uniquement dans les échantillons transformés et pas dans le témoin. Nous pouvons en déduire qu'Arf1-N-ter-YFP migre à la même position que Arf1 endogène. Nous pouvons conclure que les protéines étiquetées sont bien présentes dans les cotylédons et que le fait de ne pas voir de fluorescence ne provient pas d'un problème d'expression des gènes introduits mais plutôt du manque d'interaction entre les protéines du couple testé.

Afin de localiser précisément l'interaction entre Memb11 et Arf1 j'ai réalisé l'expérience de BiFC dans une lignée d'*A. thaliana* sur-exprimant le marqueur de l'appareil de Golgi : ST-mRFP (P35S::ST-mRFP). ST est un peptide de la Sialyl transférase de rat suffisant pour l'adressage à l'appareil de Golgi. Cette séquence n'a pas d'impact sur le fonctionnement de la voie sécrétoire. Nous pouvons remarquer que les deux marquages co-localisent dans la cellule à côté du stomate (Fig. II-14). Il est donc possible de conclure que Memb11 et Arf1 interagissent au niveau de l'appareil de Golgi dans les cotylédons d'*A. thaliana*. La spécificité de l'interaction d'Arf1 avec Memb11 est étonnante vu l'étroite homologie avec Memb12. Afin de mieux comprendre les différences entre ces deux protéines j'ai réalisé des études structurales *in silico*.

II.4 Etude de la structure des protéines Memb11 et Memb12 par approche bio-informatique

Les études de BiFC ont permis d'observer une interaction uniquement entre Memb11 et Arf1. La différence entre Memb11 et Memb12 étant faible, existe-t-il des divergences d'un point de vue structural? Memb11 et Memb12 sont des protéines de la famille des Qb-SNARE et possèdent un domaine transmembranaire à leur extrémité C-terminale, puis un domaine coiled-coil (domaine SNARE) et enfin le domaine N-terminal. Cependant ces indications sont sommaires et pour connaître la structure détaillée des deux protéines j'ai décidé de réaliser une étude *in silico*.

II.4.A Détermination de la structure secondaire

II.4.A.a Structure générale

Pour prédire la structure secondaire de Memb11 et Memb12 le logiciel PSIPRED v3.3 développé par le « Bioinformatics Group » de l'UCL (University College London) a été utilisé. Ce logiciel donne les résultats sous forme de représentations schématiques plus didactiques que d'autres interfaces. Il utilise les réseaux de neurones pour prédire les structures secondaires avec les données de PSI-BLAST. J'ai choisi ce logiciel car il permet d'obtenir une des meilleures prédictions de structure avec un Q_3 de 81,4% ($\pm 0,6\%$) (Buchan et al., 2010). Le Q_3 permet d'évaluer la qualité d'une méthode. Il est calculé à partir de protéines dont la structure est connue en comparant la structure prédite à la structure réelle. Le Q_3 est alors le pourcentage d'acides aminés dont la structure secondaire a été correctement prédite pour trois types d'éléments de structures secondaires considérées (ici hélices α , coudes et feuillets β).

En ce qui concerne Memb11 et Memb12 (Fig. II-15), il n'y a que deux types de structures présentes : les hélices α et les coudes. Ces deux protéines sont très semblables et sont composées, d'après la prédiction, de 7 hélices α pour Memb11 et de 6 pour Memb12. Cependant l'hélice supplémentaire de Memb11 comprend seulement 3 acides aminés (L130-Q131-I132) et est séparée de l'hélice suivante par un seul acide aminé. En observant le degré de confiance assez faible de cette prédiction, représenté par les barres bleues, il a semblé plus pertinent de fusionner ces deux hélices en une seule. De plus pour Memb12, qui possède le même enchaînement d'acides aminés sur cette portion de séquence, une seule hélice est prédite.

A noter, la troisième région annotée en coude dans les deux protéines contient une proline, acide aminé particulier et connu comme casseur de structure. La présence de cet acide aminé dans les deux protéines conforte la prédiction en coude d'une région de 3 acides aminés, et cette région qui pourrait jouer un rôle essentiel dans l'articulation entre les deux hélices α .

L'analyse comparée globale des deux prédictions a permis d'identifier une réduction de la taille du premier et second coude pour Memb12 par rapport à Memb11. Les coudes sont néanmoins des structures importantes pour la formation des structures tridimensionnelles car ils apportent la flexibilité.

II.4.A.b Prédiction du domaine transmembranaire

Parallèlement à cette analyse de structure secondaire, j'ai effectué une analyse des domaines transmembranaires de ces deux protéines avec TMHMM2, TMPred, MEMSAT3 et MEMSAT-SVM. L'intérêt d'utiliser plusieurs programmes est d'en extraire le consensus et cela permet de combiner les avantages de différentes approches de prédiction de domaines transmembranaires. Ces programmes prédisent un seul domaine transmembranaire pour Memb11 et Memb12 aux positions suivantes :

TMHMM2 :	- Memb11 : 204-221 (18aa)	- Memb12 : 198-215 (18 aa)
TMpred :	- Memb11 : 203-223 (21 aa)	- Memb12 : 197-217 (21 aa)
MEMSAT3 :	- Memb11 : 202-223 (22 aa)	- Memb12 : 196-217 (22 aa)
MEMSAT-SVM :	- Memb11 : 204-222 (19 aa)	- Memb12 : 198-216 (19 aa)

Les prédictions sont en accord à 2 ou 3 acides aminés près entre les différentes méthodes. Le domaine prédit est chevauchant avec la dernière hélice α prédite par PSIPRED en position C-terminale.

II.4.A.c Etude du domaine coiled-coil

Le domaine coiled-coil est une longue hélice α de 60-80 acides aminés. Sa prédiction par PSIPRED est erronée car deux hélices au lieu d'une seule sont prédites. En faisant une recherche

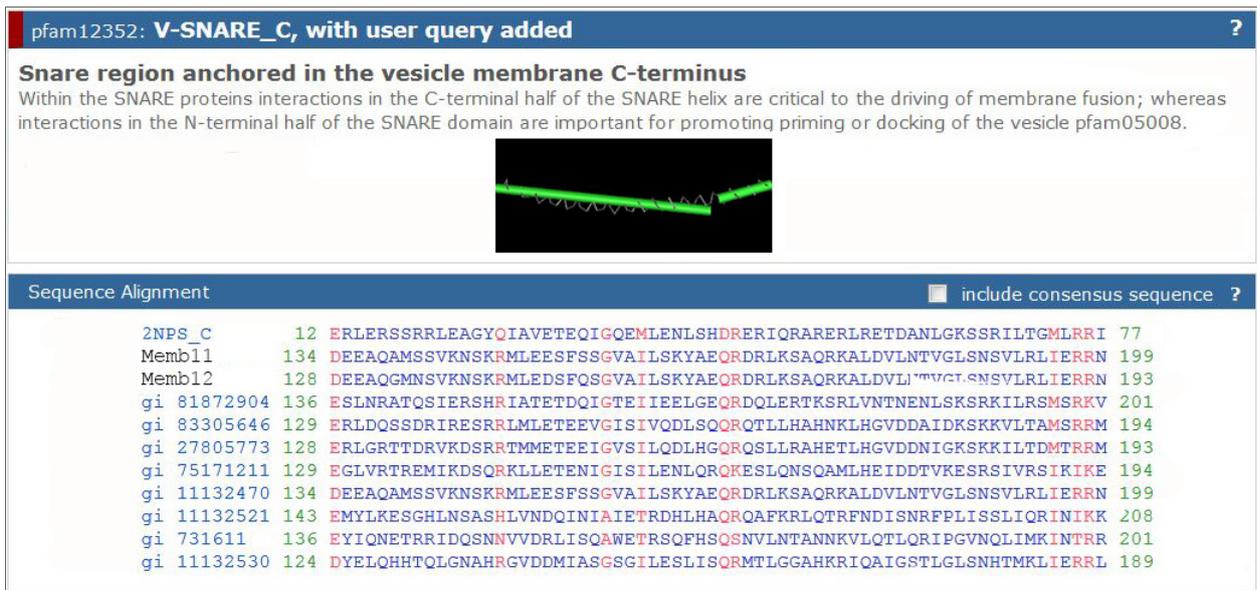


Figure II-16 : Alignement des domaines SNARE de Memb11 et de Memb12 avec les motifs V-SNARE_C recensés dans la base de données pfam. Ces domaines sont constitués d'une seule hélice α de 67 acides aminés (aa). Pour Memb11 il est positionné entre les aa 134 et 199 et pour Memb12 entre les aa 128 et 193.

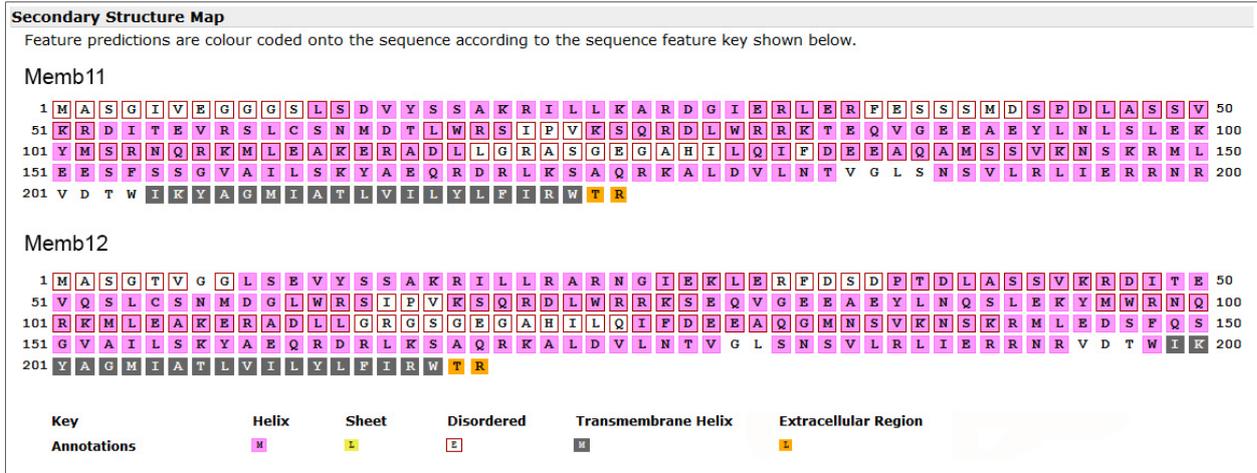


Figure II-17 : Représentation de la structure secondaire ainsi que des régions désordonnées et des domaines transmembranaires de Memb11 et de Memb12 par l'interface PSIPRED. La prédiction de la structure secondaire est réalisée par PSIPRED, des domaines désordonnés par DISOPRED et des domaines transmembranaires ainsi que de l'orientation de la protéine par MEMSAT-SVM. Pour les deux protéines, 4 domaines désordonnés sont prédits et englobent les coudes de la partie N-terminale ainsi qu'une partie du domaine coiled-coil.

par Blastp nous retrouvons dans la banque de données Pfam 27.0 une homologie avec la famille des V-SNARE_C (Marchler-Bauer et al., 2013). Cette banque de données recense les domaines en faisant des alignements entre les différentes familles de protéines. Pour Memb11 et Memb12, nous avons respectivement le domaine V-SNARE compris entre les acides aminés 134 et 199 et entre 128 et 193 (Fig. II-16). Donc il y a en fait une seule hélice α entre ces deux positions.

II.4.A.d Prédiction des régions désordonnées

De plus, j'ai effectué une recherche des régions « désordonnées » avec le logiciel DISOPRED proposé sur la plateforme de PSIPRED (Fig. II-17). Ces zones sont appelées ainsi car il est impossible de déterminer leurs structures par RMN ou par cristallographie. Il est donc probable qu'elles possèdent différentes conformations en fonction du rôle biologique qu'elles possèdent à un instant t. Elles sont connues pour être le siège de nombreuses fonctions comme l'interaction avec des protéines ou des macromolécules mais elles peuvent aussi, par exemple, se remodeler afin de permettre une action enzymatique dans certaines conditions (Buchan et al., 2010; Tompa and Fuxreiter, 2008). Il est même possible que cette capacité de remodelage soit un atout pour les interactions transitoires comme celle entre Memb11 et Arf1. Il est alors intéressant de savoir si de telles zones sont prédites dans la structure de Memb11 et Memb12. En regardant les résultats (Fig. II.17) nous pouvons remarquer que les zones de coudes coïncident avec les régions prédites comme étant désordonnées (acides aminés entourés de rouge). Ce résultat appuie l'hypothèse que l'un des coudes soit la zone permettant l'interaction de Memb11 avec Arf1.

La Fig. II-18 a été réalisée avec Photoshop afin de combiner toutes les informations acquises sur la structure secondaire des deux protéines. Cela permet d'ores et déjà d'observer une forte similitude entre les deux protéines avec comme principales différences les deux premières régions prédites en coude. Pour avoir une meilleure représentation des protéines et étendre plus loin notre analyse, leurs structures tridimensionnelles ont été recherchées.

II.4.B Détermination de la structure tridimensionnelle

Le meilleur moyen pour obtenir la structure tridimensionnelle d'une protéine est de réaliser des études de RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) ou de cristallographie par rayons X. Mais pour cela il faut posséder une grande quantité de protéine purifiée et ces études peuvent

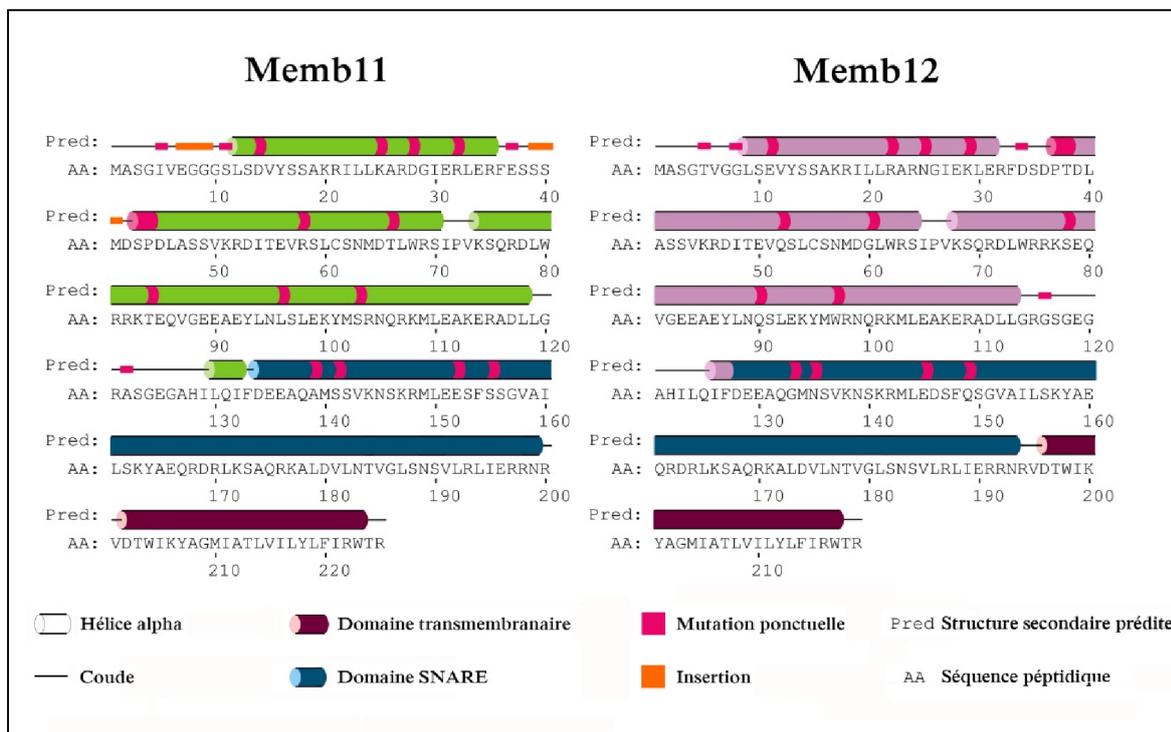


Figure II-18 : Schéma regroupant les différentes informations sur les structures 2D de Memb11 et de Memb12. Ce schéma a été réalisé avec le logiciel Photoshop. Il regroupe les informations de structure 2D ainsi que le positionnement du domaine SNARE, du domaine transmembranaire (taille maximum prédite par les différents logiciels) et des acides aminés marquant la différence entre Memb11 et Memb12.

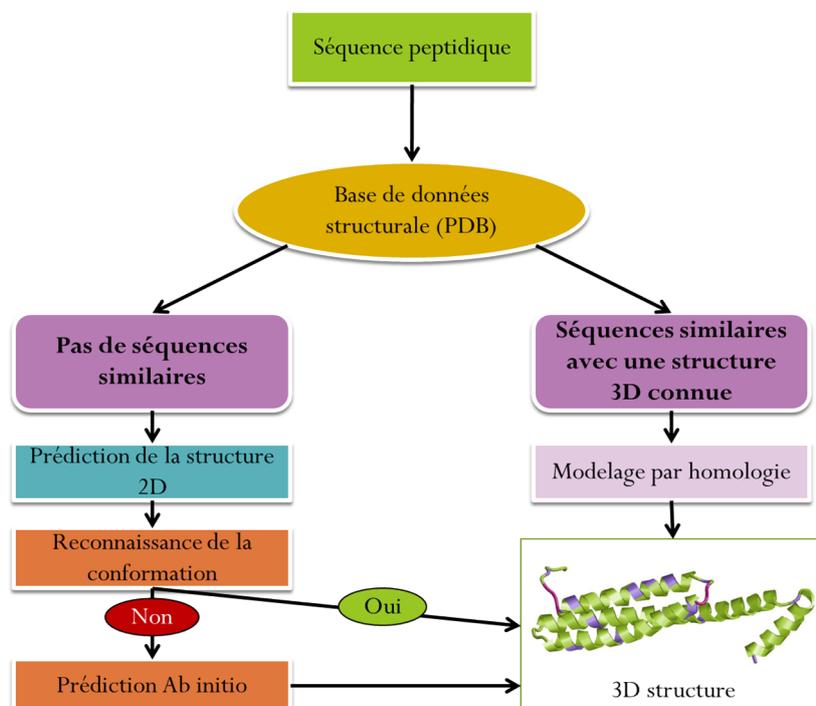


Figure II-19 : Processus de prédiction de la structure tridimensionnelle d'une protéine.

être relativement longues et leur aboutissement incertain. Ne possédant ni les protéines, ni le temps requis, j'ai décidé de réaliser une étude *in silico*, qui m'a fourni les indications nécessaires à l'orientation de mes futurs travaux pour déterminer la zone de Memb11 permettant l'interaction avec Arf1.

II.4.B.a Le choix de la méthode de prédiction de la structure 3D

Pour établir des modèles 3D *in silico* de protéines il y a plusieurs stratégies possibles en fonction des informations disponibles. Il existe trois types de méthodes dites computationnelles (Fig. II-19) qui dépendent de l'existence ou non d'une ou plusieurs protéines modèles dans la banque de données PDB (Protein Data Bank), appelées « templates ». Cette base de données recense toutes les structures obtenues par cristallographie et RMN. La séquence peptidique de la protéine étudiée est comparée aux différentes bases de données peptidiques existantes puis :

- s'il existe des séquences similaires proches, du point de vue évolutif, elles possèdent une structure répertoriée dans la PDB. C'est le meilleur des cas et la création du modèle de la protéine se fera alors par homologie avec les structures connues et permettra d'obtenir une représentation 3D fortement résolutive.

- s'il n'y a pas de séquences similaires, il convient d'utiliser des algorithmes de reconnaissance de repliement appelés méthodes de « threading » qui s'appuient sur le fait que des protéines dont l'origine est différente peuvent avoir la même structure. La méthode permet ainsi de comparer la prédiction de la structure 2D (feuillet β et hélices α exclusivement en omettant les coudes) de notre protéine directement avec les structures de la PDB. S'il existe des similitudes, il sera possible de créer un modèle par homologie.

- s'il n'existe pas de structures similaires, la modélisation *ab initio* sera utilisée. Elle permet de prédire la structure 3D sans aucun modèle, grâce à des algorithmes de calcul se basant sur les données physico-chimique des acides aminés et les probabilités pour que tel ou tel acide aminé se retrouve dans une conformation donnée (en se basant sur les structures connues). Cette technique est moins fiable que les deux précédentes mais permet néanmoins d'obtenir des modèles pour de courtes séquences peptidiques ne dépassant pas les 120 acides aminés.

À l'heure actuelle, les logiciels permettant d'obtenir les meilleurs modèles sont ceux reposant sur des approches composites, lesquelles combinent différentes techniques allant des méthodes de « threading » à celles de modélisations *ab initio*.

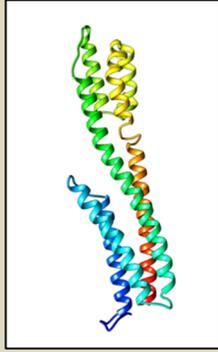
Modèle 1

Modèle 2

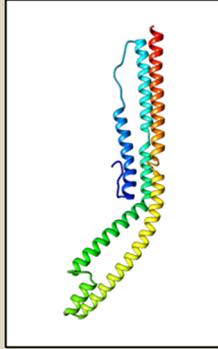
Modèle 3

Modèle 4

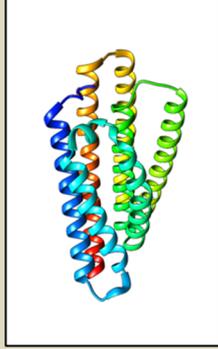
Modèle 5



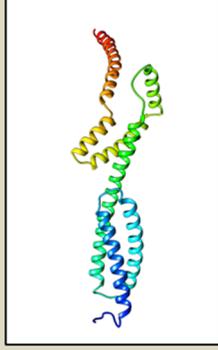
C-score : -3,21



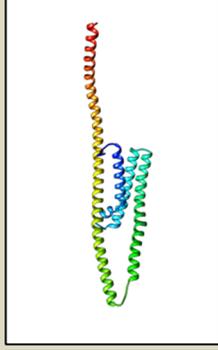
C-score : -3,50



C-score : -3,62

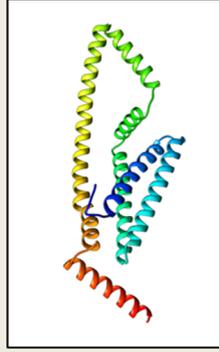


C-score : -3,75

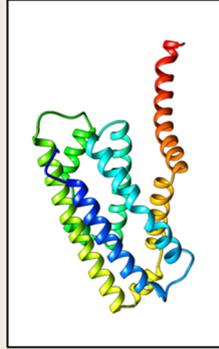


C-score : -4,10

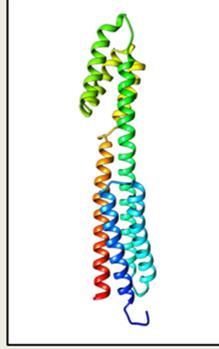
a



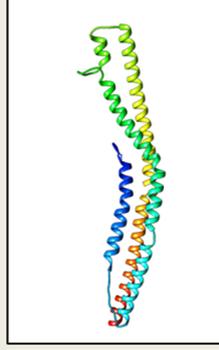
C-score : -4,29



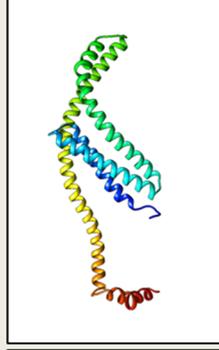
C-score : -4,45



C-score : -4,51

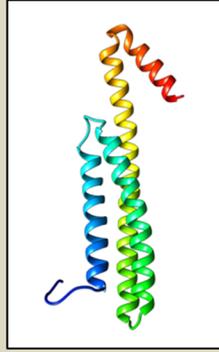


C-score : -4,84

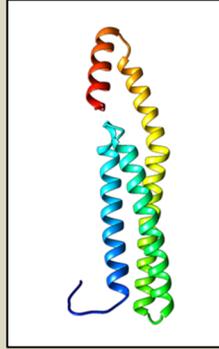


C-score : -5

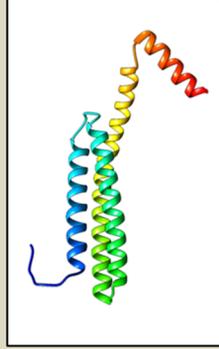
b



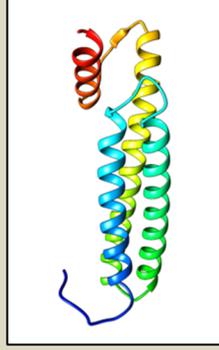
C-score : -1,93



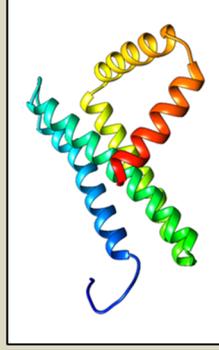
C-score : -2,22



C-score : -2,82

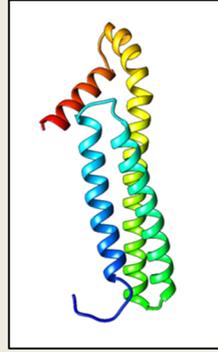


C-score : -5

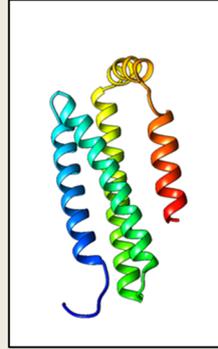


C-score : -5

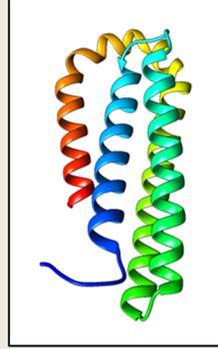
c



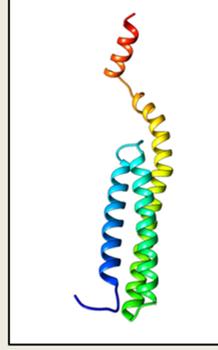
C-score : -2,68



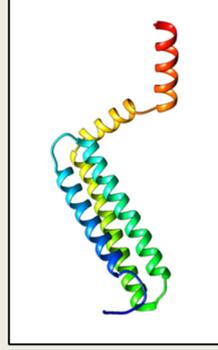
C-score : -3,41



C-score : -2,93



C-score : -3,41



C-score : -4,43

d

II.4.B.b Utilisation d'une méthode composite pour Memb11 et Memb12

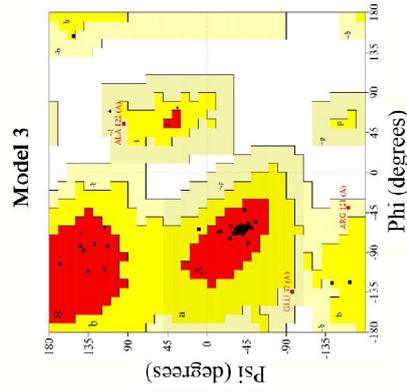
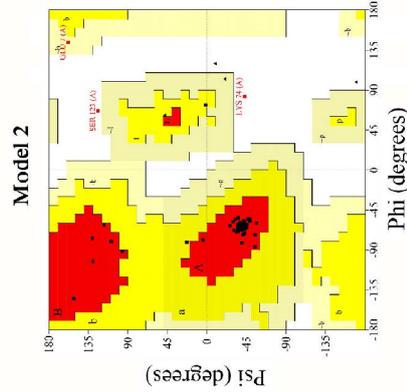
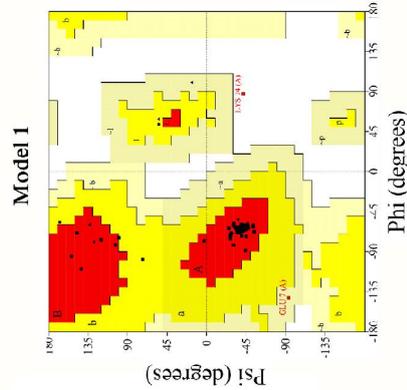
En ce qui concerne les protéines Memb11 et Memb12, il n'existe pas de protéines proches dont la structure est connue. J'ai donc essayé une méthode de modélisation composite. Pour cela j'ai choisi d'utiliser le logiciel I-TASSER (Iterative Threading ASSEmbly Refinement) du Yang Zhang Lab (Roy et al., 2010). Mon choix s'est porté sur celui-ci car il a obtenu les meilleurs résultats lors des deux derniers CASP (Critical Assessment of protein Structure Prediction). Les CASP sont des concours internationaux ayant lieu tous les deux ans lors desquels s'affrontent les différentes plateformes de prédictions (une centaine de laboratoires). Ils doivent prédire la structure 3D de protéines ayant déjà été déterminées par les méthodes conventionnelles (RMN ou cristallographie) mais qui ne sont pas encore présentes dans la base de données PDB. Cela permet ensuite de vérifier la justesse de la prédiction.

Le logiciel propose cinq modèles de structure 3D et pour chacun un C-score est attribué. Ce score permet d'estimer la certitude de la prédiction de la structure. Le C-score est compris entre -5 et 2 et plus celui-ci est élevé, plus la certitude est bonne. Il est généralement admis qu'un modèle ayant un repliement convenable possède un C-score supérieur à -1,5. Les résultats obtenus pour Memb11 et Memb12 ne sont pas satisfaisants. Les C-scores sont compris entre -4,10 et -3,21 pour Memb11 (Fig. II-20a) et entre -5 et -4,39 pour Memb12 (Fig. II-20b), ce qui est vraiment trop faible pour utiliser les modèles. La raison de ce mauvais score est liée à l'existence du domaine SNARE et du domaine transmembranaire de Memb11 ou de Memb12 qui présentent une très forte homologie avec le domaine C-terminal de protéines cristallisées. Les autres régions de la protéine sont alors « mises de côté ». Comme les différences majeures entre Memb11 et Memb12 semblent focalisées sur la région N-terminale, j'ai décidé de restreindre la modélisation sur cette région en amont du domaine SNARE, soit des acides aminés 1 à 139 pour Memb11 et 1 à 133 pour Memb12. Les C-scores obtenus lors de cette seconde prédiction sont améliorés et vont de -5 à -1,93 pour la partie N-terminale de Memb11 (Fig. II-20c) et de -4,43 à -2,68 pour la partie N-terminale de Memb12 (Fig. II-20d). J'ai ensuite filtré les résultats pour ne conserver que les modèles dont les C-scores sont supérieurs à -3, et ainsi réduit le nombre de modèles à trois pour Memb11 (n°1, 2 et 3) et deux pour Memb12 (n°1 et 3).

Figure II-20, page ci-contre: Ensemble des modèles créés par I-TASSER pour Memb11 et Memb12. Modèles obtenus à partir de : a) Memb11 entière, b) Memb12 entière, c) la partie N-terminale de Memb11 (aa 1 à 139), d) la partie N-terminale de Memb12 (aa 1 à 133). Pour chaque modèle un C-score, fourni par le logiciel, permet d'estimer la vraisemblance du modèle. Pour qu'il soit considéré comme fiable, il faut une valeur de C-score supérieure à -1,5. Ici, aucun des modèles n'obtient un tel score. Cependant ceux créés à partir des domaines N-terminaux sont plus proches de cette valeur que ceux créés à partir des protéines entières. Les représentations ont été obtenues avec le logiciel UCSF Chimera et la coloration arc-en-ciel va du bleu pour la partie N-terminale jusqu'au rouge pour la partie C-terminale.

N-terminal part of Memb11

Ramachandran Plot



Most favoured regions
Additional allowed regions
Generously allowed regions
Disallowed regions

Sequences and Ramachandran regions

Model	Sequence	Most favoured	Allowed	Generous	Disallowed
Model 1	MASGIVEGGGSLSDVYSSAKRIILLKARDGIERLERFESSMDSPLASSVKRDI TEVRSICSNNDTWRSIPVKSQRDIWRRKTEQVGEAEYLNLSLEKYSNRQRMLEAKERADLLGRASGEGGAHLLQIFDEEAQA	▲	■	■	■
Model 2	MASGIVEGGGSLSDVYSSAKRIILLKARDGIERLERFESSMDSPLASSVKRDI TEVRSICSNNDTWRSIPVKSQRDIWRRKTEQVGEAEYLNLSLEKYSNRQRMLEAKERADLLGRASGEGGAHLLQIFDEEAQA	▲	■	■	■
Model 3	MASGIVEGGGSLSDVYSSAKRIILLKARDGIERLERFESSMDSPLASSVKRDI TEVRSICSNNDTWRSIPVKSQRDIWRRKTEQVGEAEYLNLSLEKYSNRQRMLEAKERADLLGRASGEGGAHLLQIFDEEAQA	▲	■	■	■

Plot statistics

	Model 1	Model 2	Model 3	
Residues in most favoured regions [A,B,L]	120	96.8%	119	94.4%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	4	3.2%	1	0.8%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	1	0.8%	1	0.8%
Residues in disallowed regions	1	0.8%	2	1.6%
Number of non-glycine and non-proline residues	126	100.0%	126	100.0%
Total number of residues	139	139	139	

G-Factors	Model 1	Model 2	Model 3
Parameter :	Average score	Average score	Average score
Dihedral angles :	0.22	0.25	0.22
Main-chain covalent forces :	-0.33	-0.23	-0.33
Overall average :	0.02	0.08	0.02

G-factor provide a measure of how unusual, or out-of-ordinary, a property is.
Value below -0.5* unusual;
Value below -1.0** highly unusual

Important note : The main-chain bond-lengths and bond angles are compared with the Engh and Huber (1991) ideal values derived from small-molecule data. Therefore, structures refined using different restraints may show apparently large deviations from normality.

II.4.B.c Vérification de la fiabilité des modèles

Les modèles obtenus doivent ensuite subir des tests afin de vérifier s'ils répondent aux différents critères des structures connues. Pour cela les logiciels PROCHECK et QMEAN sont utilisés.

II.4.B.c.1 Vérification par PROCHECK

Procheck étudie la qualité stéréochimique du modèle en analysant la géométrie de chaque acide aminé et permet de savoir si elle est habituelle ou non. Le résultat s'observe sous forme de diagrammes dont celui de Ramachandran. Dans ce dernier, les acides aminés sont placés suivant les angles de torsion Psi et Phi entre les liaisons peptidiques (Fig. II.21).

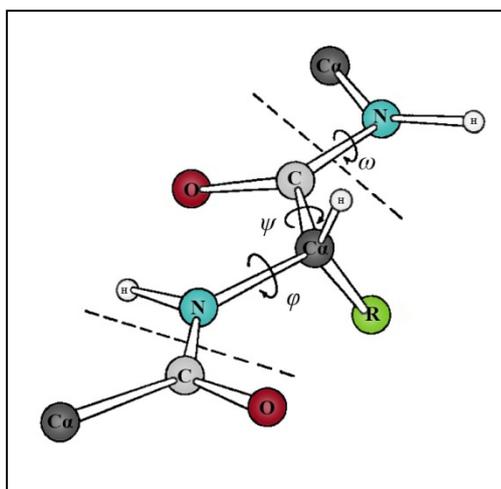
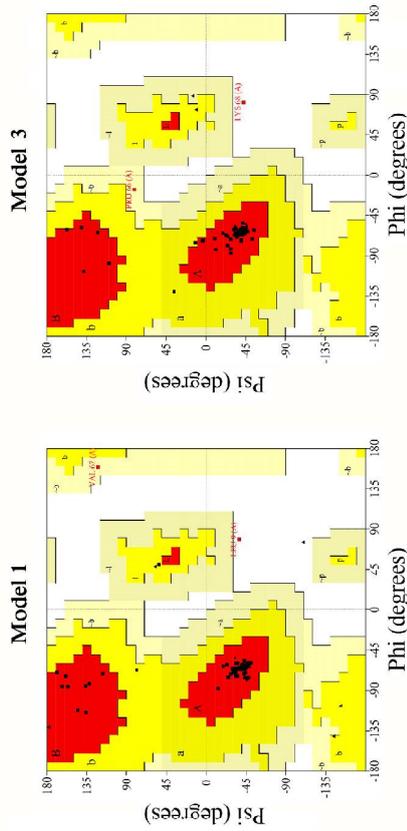


Figure II-21: Représentation des angles dièdres d'une séquence peptidique (modifié d'après Flamenbaum et al., 1979). Les pointillés délimitent un acide aminé.

Quatre différents types de zones γ sont représentés, elles correspondent aux positions plus ou moins naturellement retrouvées dans les structures de la PDB. Les quatre régions, représentées par une couleur allant du rouge au blanc sont les suivantes : les « plus favorables » en rouge, les « acceptables additionnelles » en jaune, les « généreusement acceptables » en beige, et

Figure II-22, page ci-contre: Données fournies par le logiciel PROCHECK permettant la vérification des modèles 1, 2 et 3 de la partie N-terminale de Memb11 obtenus par I-TASSER. a) Les diagrammes de Ramachandran situent tous les acides aminés d'un modèle dans des zones plus (zone rouge) ou moins favorables (zone blanche) en fonction de leurs angles Phi et Psi. b) Les zones obtenues par les diagrammes pour chaque acide aminé sont schématisées en dessus des séquences peptidiques des modèles. c) Le « Plot statistics » reprend sous forme numérique les données des diagrammes. d) Les données du « G-Factor » sont calculées en prenant en compte les angles de torsion et les forces covalentes. D'après ces données les trois modèles sont fiables avec une préférence pour le modèle 2.

N-terminal part of Memb12**Ramachandran Plot**

Model 1 ▲ ■ ■ ■ ▲ Most favoured
 MASGTGGLSVYSSAKRILLRAINGIEKLERFSDPTDLASSVKRRDITVEQSLCSNMDGLWRSIPVKSQRDLWRRKSEQVGEAEYLNQSLKTYMRNQRKMLEAKERADLLGRSGEGAHILQIFDEEAQG

Model 3 ▲ ■ ■ ■ ▲ Most favoured
 MASGTGGLSVYSSAKRILLRAINGIEKLERFSDPTDLASSVKRRDITVEQSLCSNMDGLWRSIPVKSQRDLWRRKSEQVGEAEYLNQSLKTYMRNQRKMLEAKERADLLGRSGEGAHILQIFDEEAQG

Plot statistics

	Model 1	Model 3
Residues in most favoured regions [A,B,L,I]	116 97.5%	116 97.5%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,i,p]	1 0.8%	2 1.7%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	1 0.8%	0 0.0%
Residues in disallowed regions	1 0.8%	1 0.8%
Number of non-glycine and non-proline residues	119 100.0%	119 100.0%
Total number of residues	133	133

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

G-Factors

Parameter :	Model 1	Model 3
Dihedral angles :	0.22	0.27
Main-chain covalent forces :	-0.22	-0.28
Overall average :	0.06	0.08

G-factor provide a measure of how unusual, or out-of-ordinary, a property is. Value below -0.5* unusual Value below -1.0 highly unusual**

Important note : The main-chain bond-lengths and bond angles are compared with the Trigg and Huber (1991) ideal values derived from small-molecule data. Therefore, structures refined using different restraints may show apparently large deviations from normality.

les « refusées » en blanc. Pour qu'un modèle soit validé, 90% de ces acides aminés doivent être positionnés dans la première catégorie et aucun dans la région refusée. Le logiciel propose toute une suite de diagrammes reprenant chaque type d'acides aminés, chaque angle, etc. Pour plus de clarté seul le diagramme de Ramachandran et les chiffres associés aux différents calculs réalisés par le logiciel (« Plot statistics » qui correspondent au diagramme de Ramachandran et les « G-Factors » qui prennent en compte les angles de torsions et les forces covalentes exercées dans la chaîne principale) ont été représentés. J'ai aussi ajouté une représentation de la séquence peptidique avec pour chaque position la région qui lui est associée.

Pour la partie N-terminale de Memb11 (Fig. II-22), d'après les données du diagramme de Ramachandran, le modèle 2 possède un plus grand nombre d'acides aminés dans les régions les plus favorables (96,8%) comparé au modèle 1 (95,2%) ou au modèle 3 (94,4%). Cependant le modèle 2 a également un plus grand nombre de résidus impliqués dans les régions refusées avec 1,6% soit 2 acides aminés alors que le modèle 1 n'en a qu'un et le modèle 3 n'en a pas. A partir de ces résultats, il est difficile de déterminer quel est le meilleur modèle.

En ce qui concerne les données des facteurs G, il faut que les valeurs des scores soient le plus élevées possibles et supérieures à -0,5. Ici, c'est le modèle 2 qui a les meilleurs résultats pour les trois mesures. En conclusion, les résultats obtenus avec le logiciel PROCHECK ne nous ont pas permis de trancher de manière claire entre les différents modèles, mais nous ont permis d'avoir une préférence pour le second.

Pour la région N-terminale de Memb12 (Fig. II-23), le diagramme de Ramachandran ainsi que les données des facteurs G indiquent que le modèle 3 est légèrement plus fiable que le 1. Effectivement, bien que les deux modèles possèdent autant de résidus dans les régions favorables (97,5%), le modèle 3 a deux résidus dans les régions additionnelles et aucun dans les régions généreusement acceptées alors que le modèle 1 en a un dans ces deux régions. De plus les deux modèles possèdent un acide aminé dans les régions refusées, mais pour le modèle 1, il se situe au début de la séquence peptidique (L9), dans le premier coude (zone comportant des différences avec Memb11) alors que pour le modèle 3, celui-ci est situé en position 68, après la zone d'intérêt.

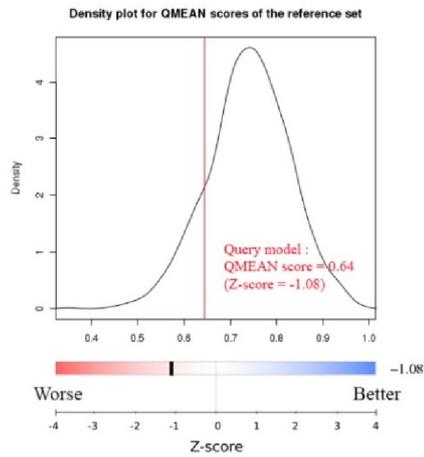
Figure II-23, page ci-contre: Données fournies par le logiciel PROCHECK permettant la vérification des modèles 1 et 3 de la partie N-terminale de Memb12 obtenus par I-TASSER. a) Les diagrammes de Ramachandran situent tous les acides aminés d'un modèle dans des zones plus (zone rouge) ou moins favorables (zone blanche) en fonction de leurs angles Phi et Psi. b) Les zones obtenues par les diagrammes pour chaque acide aminé sont schématisées en dessus des séquences peptidiques des modèles. c) Le « Plot statistics » reprend sous forme numérique les données des diagrammes. d) Les données du « G-Factor » sont calculées en prenant en compte les angles de torsion et les forces covalentes.

D'après ces données les deux modèles sont fiables avec une préférence pour le modèle 1.

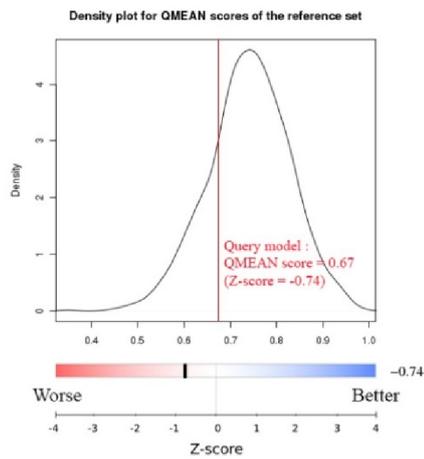
QMEAN results

N-terminal part of Memb11

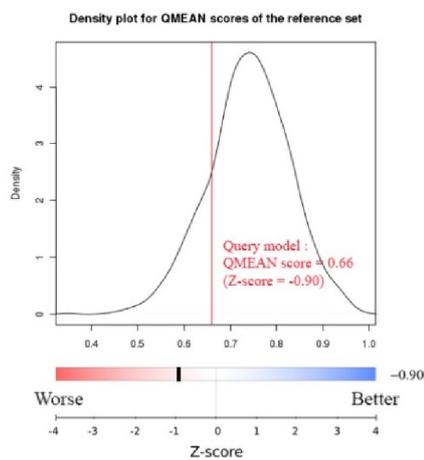
Model 1



Model 2

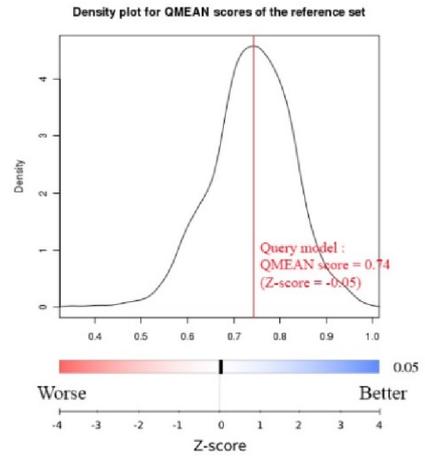


Model 3

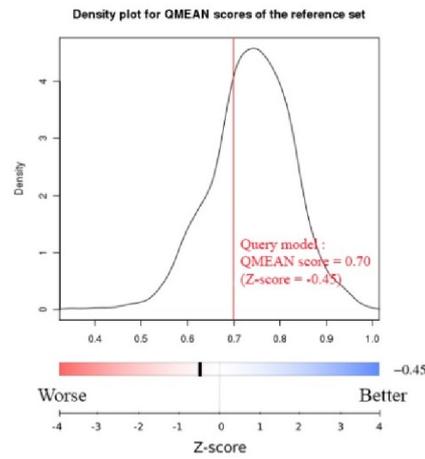


N-terminal part of Memb12

Model 1



Model 3



Reference sets for establishment of the density plots :

N-terminal part of Memb11:
N=1047
Structure of size 139 (+/- 10%) residues

N-terminal part of Memb12:
N=1066
Structure of size 133 (+/- 10%) residues

Il semble donc logique de privilégier la structure dont la position de l'acide aminé « refusé » soit hors de la zone d'intérêt, soit la structure du modèle 3.

En conclusion, après analyse des cinq modèles avec le logiciel PROCHECK il en ressort que pour la région N-terminale de Memb11, il est difficile de ne choisir qu'un seul modèle et que pour Memb12 le modèle 3 est le plus vraisemblable. Pour affiner cette analyse, j'ai utilisé un second logiciel de vérification : QMEAN.

II.4.B.c.2 Vérification par QMEAN

QMEAN permet de mesurer la qualité du modèle en prenant en compte différents critères comme les angles de torsion (ϕ , ψ et ω) (Fig. II-21) mais aussi l'énergie nécessaire à l'interaction entre les atomes, l'accessibilité aux solvants ... Cette mesure est comprise entre 0 pour un modèle de mauvaise qualité et 1 pour un modèle très fiable. Cette mesure est normalisée en la comparant aux protéines de la PDB de taille équivalente à celle du modèle analysé. Le logiciel calcule aussi un QMEAN Z-score qui représente la probabilité qu'une telle structure soit comparable à celles obtenues par cristallographie. Le Z-score est aussi une valeur normalisée et plus il est proche de zéro plus le modèle est fiable.

Pour la partie N-terminale de Memb11 (Fig. II-24), en utilisant ce logiciel, nous pouvons remarquer qu'il y a peu de différence entre les trois modèles avec une valeur de QMEAN comprise entre 0.64 pour le modèle 1 et 0.67 pour le modèle 2. Et un Z-score entre -0.74, pour le modèle 2, et -1.08, pour le modèle 1. Avec cette méthode, le modèle 2 semble encore légèrement plus fiable. Cependant les valeurs des deux autres modèles sont très proches.

Comme je n'ai pas réussi à déterminer lequel des trois modèles de la partie N-terminale de Memb11 était le meilleur, j'ai décidé d'aligner les trois structures afin de comparer visuellement les différences. Pour cela j'ai utilisé le logiciel UCSF Chimera. En superposant les modèles (Fig. II- 25), nous pouvons remarquer qu'ils sont extrêmement semblables et que la principale

Figure II-24, page ci-contre : Données obtenues avec le logiciel QMEAN permettant d'évaluer la vraisemblance des modèles 1 à 3 obtenus pour la partie N-terminale de Memb11 et des modèles 1 et 3 pour la partie N-terminale de Memb12. Les graphiques de densité représentent la distribution des « QMEAN scores » obtenus pour N structures de la PDB ayant la même taille que les séquences testées (+/- 10%). La barre rouge est positionnée au niveau du score de la protéine. Le Z-score quant à lui doit être positionné dans les zones blanches au plus proche du zéro dans la barre. Pour Memb11, le Modèle 2 présente le meilleur « QMEAN score » (au plus proche du sommet de la courbe de distribution) et le meilleur Z-score. Pour Memb12, le modèle 1 possède un « QMEAN score » excellent car il est comparable à celui obtenu par la majorité des structures utilisées pour réaliser le graphique et son Z-score est très proche de 0.

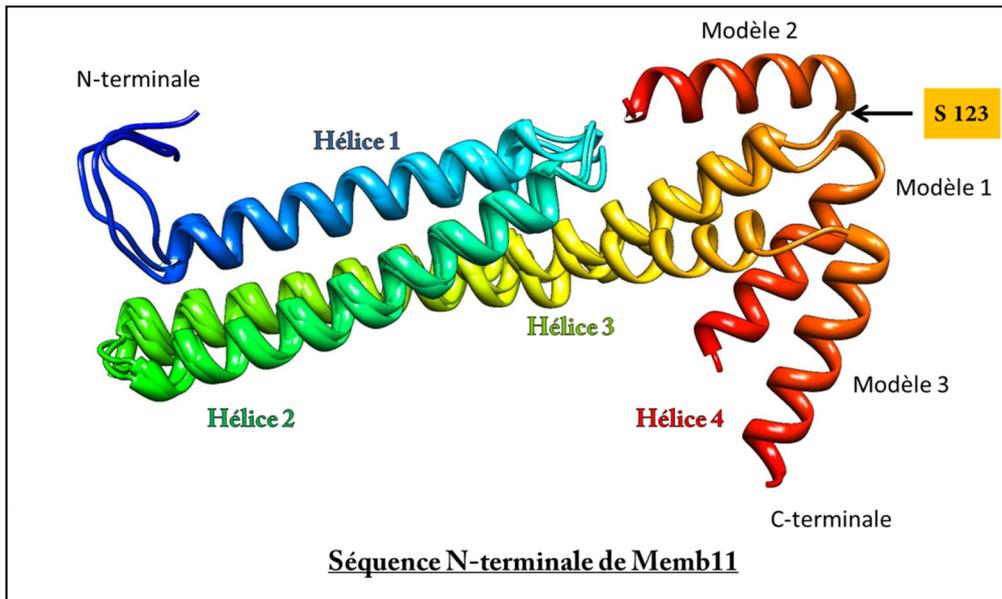


Figure II-25: Alignement des structures 3D des modèles 1, 2 et 3 de la partie N-terminale de Memb11. Cet alignement a été réalisé avec le logiciel de visualisation UCSF Chimera. Le début des structures est fortement similaire puis à partir de la moitié de l'hélice 3 la structure secondaire reste la même mais le repliement diffère entre les modèles. Les hélices 4 des modèles 1 et 3 ont la même orientation contrairement à celle du modèle 2 qui revient vers les hélices 1 et 2.

différence se retrouve au niveau C-terminal (à la fin de l'hélice 3 et au niveau du dernier coude). L'hélice 4 (correspondant au début du domaine SNARE) du modèle 2 revient vers la structure et, si la protéine était entière, recouvrirait les hélices 1 et 2 ainsi que le deuxième coude. Cependant, en se basant sur les résultats du diagramme de Ramachandran, l'acide aminé 123 situé à la fin du coude 4 a été placé dans la région refusée, donc il est vraisemblable que cette conformation ne soit pas naturelle. La position la plus adéquate pour la dernière hélice semble donc être celle proposée par les modèles 1 ou 3. De plus, le C-score calculé par I-TASSER étant plus élevé pour le modèle 1 (-1,93) que pour le modèle 3 (-2,82), le numéro 1 est retenu pour la comparaison avec la structure de Memb12.

Pour la partie N-terminale de Memb12 (Fig. II-24), QMEAN laisse penser que le modèle 1 est plus fiable avec un QMEAN score de 0.74 (valeur maximale qui correspond à la valeur obtenue par la majorité des structures de la même taille dans la PDB) et un Z-score de 0.05. Le modèle 3 quant à lui possède un QMEAN score de 0.70 et un Z-score de -0.45.

Donc pour Memb12, PROCHECK favorise le modèle 3 et QMEAN le modèle 1. Pour les départager, comme pour Memb11, le C-score donné par I-TASSER est pris en compte. Le modèle 1 sera donc utilisé pour le reste des études.

Pour conclure, les modèles 1 de la partie N-terminale de Memb11 et de Memb12 seront utilisés pour analyser les structures et localiser les différences.

Il faut tout de même garder à l'esprit que tous ces modèles ne sont que des prédictions.

II.4.C Observation des structures et comparaisons

Maintenant que les modèles de Memb11 et de Memb12 ont été sélectionnés, leurs structures vont être comparées (Figs. II-26 et II-27).

Les structures des modèles des deux protéines sont très proches. Seule l'hélice 4 possède un positionnement différent. Cependant, c'est aussi au niveau de la position de cette hélice que les différents modèles pour chaque protéine ne sont pas en accord. Il est donc préférable de ne pas trop se fier à ces positions.

En ce qui concerne les différences entre les séquences peptidiques de Memb11 et de Memb12, il est intéressant de remarquer que ces acides aminés (colorés en mauve pour Memb11

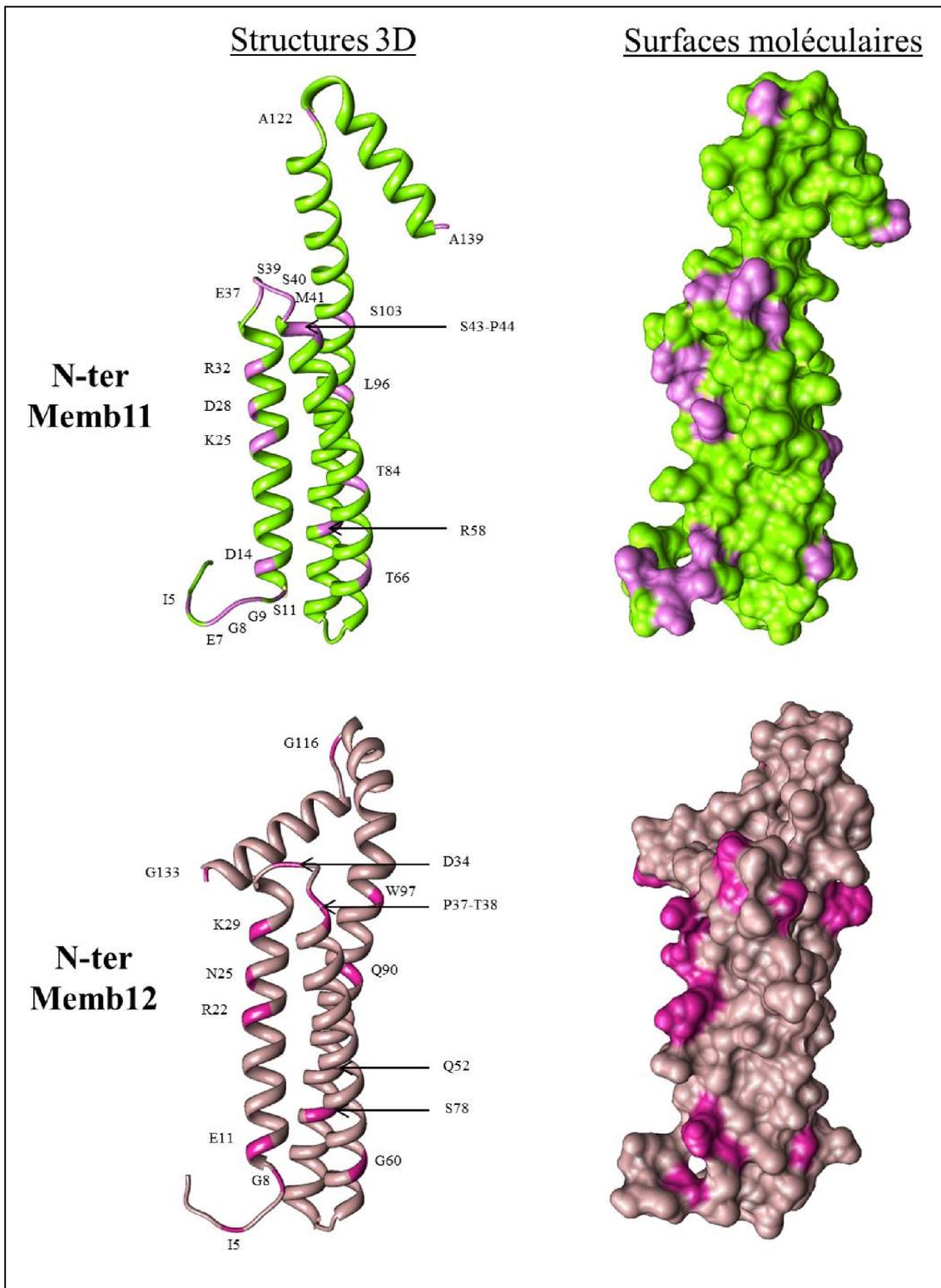


Figure II-26: Représentation de la structure 3D et de la surface moléculaire de la partie N-terminale de Memb11 et de Memb12 avec le logiciel de visualisation UCSF Chimera. Les différences d'acides aminés entre les deux protéines sont visualisées en violet et fuchsia. Sur les représentations de la surface moléculaire, tous ces acides aminés différents sont en surface et donc accessibles pour une potentielle interaction.

et en violet pour Memb12) sont positionnés dans des régions fortement accessibles. Les résidus K25-D28-R32 de Memb11 remplacés par R22-N25-K29 dans Memb12 sont tous placés sur la face extérieure de l'hélice 1. Cet enchaînement pourrait donc former un site important pour une activité spécifique à Memb11 ou à Memb12. C'est donc une zone potentielle pour l'interaction de Memb11 avec Arf1.

Le fait que les coudes 1 et 2 soient plus longs dans la séquence de Memb11 n'apporte pas de modifications au niveau de la structure tertiaire. Cependant ils sont orientés vers l'extérieur de la structure et les acides aminés supplémentaires (E7-G8-G9 et S39-S40-M41) pourraient donc jouer eux aussi un rôle important dans l'interaction. De plus de chaque côté de l'insertion dans le coude 2, des acides aminés différents de ceux de memb12 sont présents. Cet ensemble forme un enchaînement de 8 acides aminés accessibles pour une interaction.

Les trois zones ayant été identifiées comme potentiellement intéressantes lors de la prédiction de la structure secondaire sont confirmées. Elles sont toutes les trois accessibles pour une possible interaction avec Arf1.

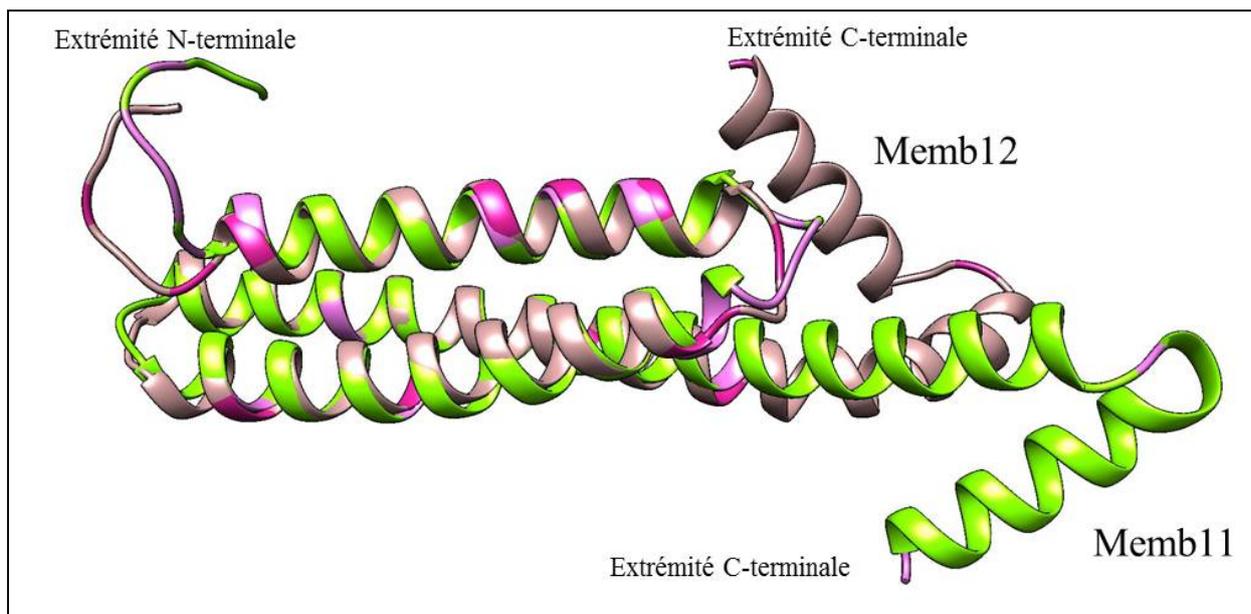


Figure II-27 : Alignement des structures 3D de la partie N-terminale de Memb11 et de Memb12 avec le logiciel de visualisation UCSF Chimera. Memb11 est représentée en vert alors que Memb12 est en beige. L'alignement est presque équivalent jusqu'à la moitié des structures puis les hélices 3 se séparent pour avoir une orientation différente.

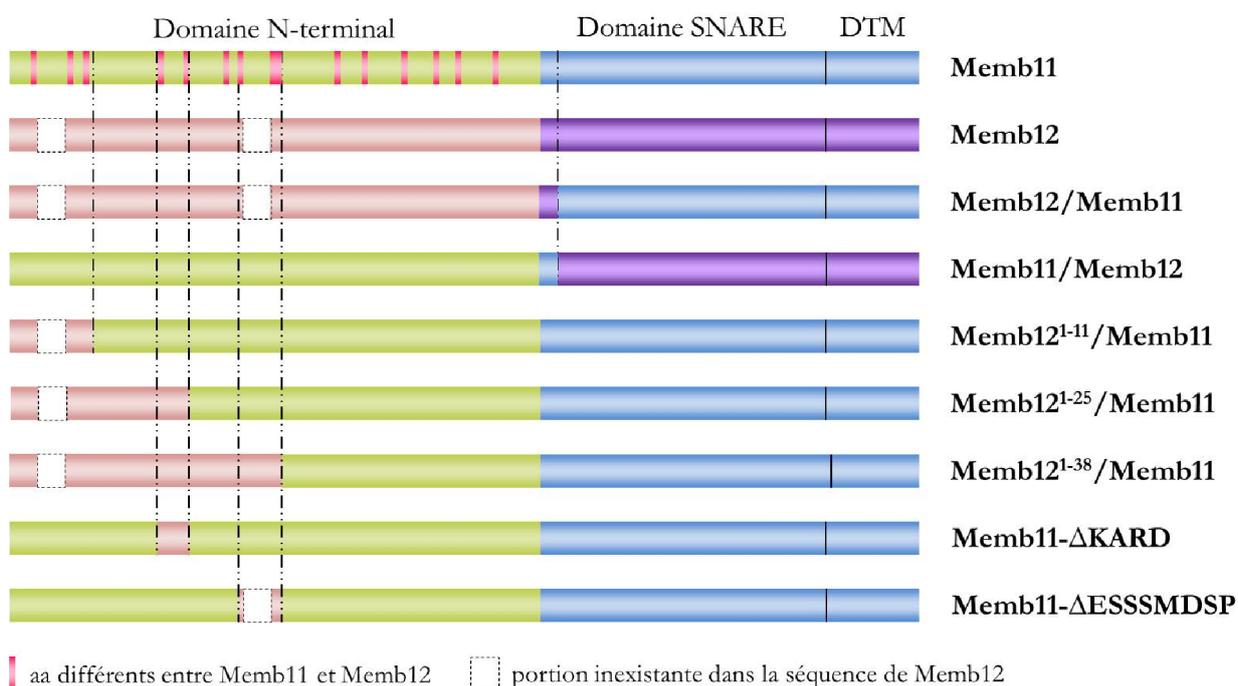


Figure II-28 : Représentation schématique des différents mutants obtenus pour les études d'interaction. Le mutant Memb12/Memb11 possède le domaine N-terminal ainsi que le début du domaine SNARE de Memb12 et le reste de la protéine de Memb11 ; le mutant Memb11/Memb12 est l'inverse de Memb12/Memb11 ; les mutants Memb12¹⁻¹¹/Memb11, Memb12¹⁻²⁵/Memb11 et Memb12¹⁻³⁸/Memb11 correspondent respectivement aux 11, 25 et 38 premiers acides aminés de Memb12 et le reste de la séquence de Memb11 ; les mutants Memb11-ΔKARD et Memb11-ΔESSMDS possèdent la séquence de Memb11 mais les portions ²⁵KARD²⁸ et ³⁷ESSMDS⁴⁴ ont été échangés respectivement par les séquences RARN et DSDPT de Memb12.

II.5 Résultats préliminaires sur la caractérisation de l'interaction Memb11-Arf1

II.5.A « Design » de mutants

Avec les indications fournies par les études bio-informatiques j'ai imaginé des mutants au niveau des trois zones potentiellement nécessaires à l'interaction avec Memb11. J'ai créé sept mutants répartis en trois catégories (Fig. II-28).

- Premièrement afin d'être sûre que l'interaction ait lieu au niveau du domaine N-terminal, j'ai échangé ce domaine (jusqu'au domaine coiled-coil) entre Memb11 et Memb12. Donc j'obtiens les deux mutants suivants : **Memb11-Memb12** et **Memb12-Memb11**.
- Deuxièmement, j'ai échangé des portions entières du domaine N-terminal de Memb11 avec celles de Memb12. J'ai ainsi créé : **Memb12¹⁻¹¹/Memb11**, **Memb12¹⁻²⁵/Memb11** et **Memb12¹⁻³⁸/Memb11**.
- Troisièmement, j'ai échangé des zones d'intérêt correspondant à des zones accessibles de la structure 3D de Memb11 par celle de Memb12. Dans un premier mutant j'ai échangé la séquence ²⁵KARD²⁸ par la séquence RARN: mutant **Memb11-ΔKARD** et dans un second j'ai échangé la séquence ³⁷ESSSMDSP⁴⁴ par la séquence DSDPT: **Memb11-ΔESSSMDSP**.

Ces différentes séquences ont été insérées dans les vecteurs de BiFC afin de savoir si les protéines mutantes allaient interagir ou pas avec Arf1.

Cependant entre les expériences menées en BiFC avec les protéines entières et les tests que je voulais réaliser avec les mutants, le laboratoire a déménagé dans de nouveaux locaux. Bien que les conditions de la chambre de culture *in vitro* soient censées être les mêmes, les plantes, à un stade précoce n'avaient pas exactement le même développement et la transformation des cotylédons en vue de l'expérience étaient impossibles. Soit mes plantes n'étaient pas du tout transformées soit au contraire les agrobactéries détruisaient les tissus (observations de plages noires, sans chlorophylle au microscope confocal).

II.5.B Etude des interactions par BiFC sur racines d'*A. thaliana*

J'ai essayé avec Frederic Delmas de l'UMR BFP (Biologie du Fruit et Pathologie) de faire de la biolistique sur racines d'*Arabidopsis thaliana*, méthode qu'il était en train de mettre au point avec son étudiant en Master 2. Je voyais dans cette technique plusieurs avantages. Premièrement je m'affranchissais des problèmes liés aux agrobactéries. Deuxièmement, je pouvais mettre sur les mêmes billes les deux vecteurs ce qui augmentait (en théorie) la probabilité d'avoir les deux protéines étiquetées produites dans les mêmes cellules. Et pour finir, l'observation se faisait dans les racines ce qui me permettait d'être dans les mêmes organes que pour les immunolocalisations.

Cependant cette technique ne m'a pas permis d'obtenir des résultats car l'efficacité de transformation est très faible (environ 1 à 2 cellules par racine) et le bruit de fond inhérent aux racines est trop élevé pour réussir à observer des appareils de Golgi émettant de l'YFP. De plus il y a énormément de nécroses cellulaires dues au bombardement avec les billes d'or.

II.5.C Etude de l'interaction par BiFC sur cotylédons d'*A. thaliana*

En parallèle, j'ai essayé de retrouver les conditions adéquates pour les transformations des cotylédons d'*A. thaliana*

J'ai alors modifié plusieurs paramètres de mon protocole :

- transformer des cotylédons plus jeunes ou plus âgés
- augmenter ou diminuer la virulence des agrobactéries en faisant varier la concentration d'acétosyringone lors de l'infiltration,
- changer la souche d'agrobactéries pour une souche moins virulente utilisée pour transformer *Nicotiana tabacum* : GV3101
- changer de chambre de culture pour les plantes avec des éclairages et des températures différentes

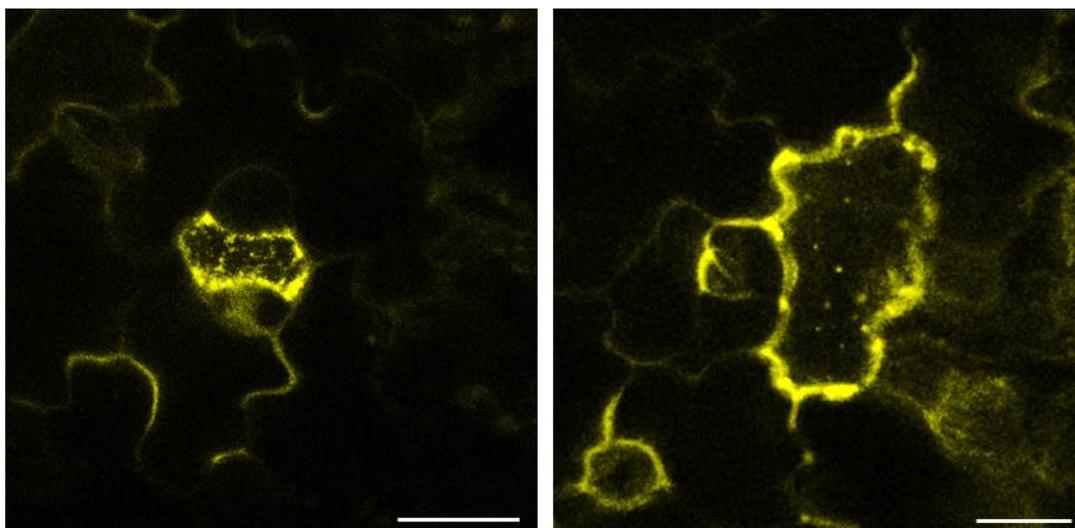


Figure II-29 : Expérience de BiFC avec le couple Memb11/Memb12-Arf1. Des points fluorescents sont observés au sein de cellules de l'épiderme de cotylédons d'*A. thaliana*. La barre d'échelle correspond à 15µm.

Constructions	Nombre moyen de cellules par cotylédon	Nombre de cotylédons observés
Memb11 Arf1	1,4	52
Memb12 Arf1	0,15	32
Sec22 Arf1	0,06	16
Memb11/Memb12 Arf1	0,75	24
Memb12/Memb11 Arf1	0,16	24
Memb11-ΔESSSMDSP Arf1	0,28	32
Memb12 ¹⁻¹¹ /Memb11 Arf1	0,18	16
Memb12 ¹⁻²⁵ /Memb11 Arf1	0	8

Figure II-30 : Tableau récapitulatif de l'expérience de BiFC entre les protéines Memb11 et Memb12 mutantes et Arf1. Est représenté le nombre de cotylédons observés et la moyenne du nombre de cellules par cotylédon présentant des ponctuations fluorescents d'une taille correspondant aux dictyosomes golgiens.

- tester une méthode d'infiltration différente : l'infiltration sous vide et non plus avec l'aide d'un détergent (Tween20)

J'ai conclu de tous ces tests que pour transformer efficacement les cotylédons d'*Arabidopsis thaliana* écotype Colombia 0 les meilleurs paramètres sont :

- conditions de culture : éclairage à 150 μmol de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, jours longs, 22°C le jour et 20°C la nuit, tamis en plastique de 500 μm (pour éviter le déracinement des plantules lors de leur transformation)
- âge des plantules utilisées : 4 jours
- condition de transformation : souche d'agrobactéries de départ C58C1, 200 μM d'acétosyringone dans le milieu MS liquide et une infiltration sous vide.

Après plusieurs essais infructueux, j'ai enfin réussi à retrouver des conditions propices à l'interaction et donc à la visualisation du BiFC en septembre dernier. J'ai donc pu tester les premiers mutants mais ce ne sont que des résultats préliminaires (Fig II-29).

Nous pouvons d'ores et déjà voir que l'efficacité de transformation n'est pas aussi bonne que lors des premiers tests mais une nette différence est tout de même observée entre Memb11 et Memb12 /Sec22 qui ont respectivement 1.4, 0.15 et 0.06 cellules fluorescentes présentant des punctuations semblables à des dictyosomes golgiens par cotylédon (Fig. II-30). En comparant les mutants nous pouvons remarquer que Memb12/11 donne presque le même résultat que Memb12. De plus les observations de Memb11/12-Arf1 sont semblables à celles de Memb11-Arf1 (Fig. II-29). L'interaction de Memb11 avec Arf1 semble donc avoir lieu au niveau du domaine N-terminal. De plus les trois autres mutants testés ont un nombre moyen de cellules fluorescentes très faible, ce qui semble indiquer que l'interaction a lieu entre les acides aminés 1 et 44 et que la séquence ESSMDSPP peut y jouer un rôle (Fig. II-30).

Pour conclure nous pouvons dire que l'interaction de Memb11 avec Arf1 semble se faire dans la région N-terminale de Memb11 et plus précisément entre les acides aminés 1 et 44 (après la séquence ESSMDSPP). Cependant ces résultats ne sont le fruit que d'une seule expérience et il faudra la répéter au moins deux fois.

III DISCUSSION ET PERSPECTIVES

III.1 Discussion et perspectives à court terme (article en préparation)

Les expériences d'immunoprécipitations avec l'anticorps anti-Memb11 ont mis en évidence une interaction entre les SNAREs Memb11 et/ou Memb12 et une ou plusieurs isoformes de la GTPase Arf1. Cependant il est impossible de savoir laquelle des six isoformes est co-immunoprécipitée car ces protéines possèdent 99% d'identité. J'ai alors décidé d'utiliser ArfA1c (AT2G47170) car cette isoforme avait été utilisée pour démontrer l'implication d'Arf1 dans le transport intracellulaire par Lee *et al.* en 2002 (Lee et al., 2002). Comme l'action d'Arf1 est cyclique nous pouvons penser que l'interaction avec Memb11 et/ou Memb12 est transitoire. Cependant cette interaction n'en est pas moins forte car lors des immunoprécipitations, aucun agent de pontage n'a été ajouté.

Les études de BiFC ont permis de déterminer que seule Memb11 interagit avec Arf1. Malgré les 89% d'identité entre Memb11 et Memb12, cette dernière ne montre aucune affinité pour Arf1 *in vivo*. Toutefois, les études de BiFC ne démontrent pas une interaction directe entre ces deux protéines car une certaine distance entre les deux parties de l'YFP est tolérée, il n'est donc pas exclu que ces deux protéines fassent partie d'un complexe plus important.

Le complexe Memb11-Arf1 est localisé au niveau de l'appareil de Golgi. Nous avons pu le voir avec les études de BiFC sur des plantes exprimant de façon stable un marqueur golgien (ST-mRFP) où les deux marquages co-localisent. Afin de mieux définir le lieu de l'interaction, des immunolocalisations avec l'anti-Memb11 observées par MET ont permis de positionner Memb11 au niveau des saccules *cis*-golgiens. Mais l'orientation des dictyosomes golgiens n'est basée que sur des critères morphologiques, donc pour confirmer la localisation sub-cellulaire, des essais de co-immunolocalisations avec un anticorps anti-Syp61 (SNARE localisée au niveau du TGN (Uemura et al., 2004)) sont en cours. De plus il serait intéressant de réaliser une quantification des transcrits de Memb11 et de Memb12 sur des racines de plantes au même stade que celles utilisées pour l'immunolocalisation. Cela pourrait confirmer (ou pas) les données de Genevestigator sur la présence beaucoup plus importante de transcrits de Memb11 par rapport à ceux de Memb12.

Des études structurales *in silico* ont été réalisées afin de mieux caractériser l'interaction et comprendre pourquoi Memb12 n'interagit pas avec Arf1. Il en est ressorti que la structure de Memb11 est très proche de celle de Memb12, formée exclusivement d'hélices α et de coudes,

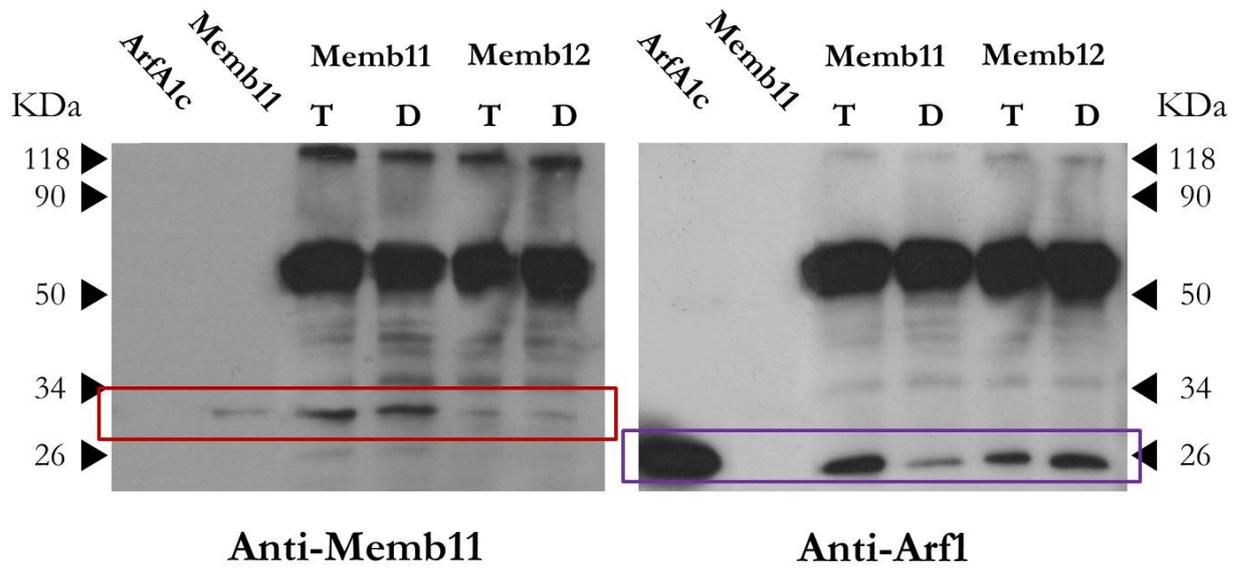


Figure III-1 : Immunoprécipitations avec l'anti-Memb11 sur des mélanges de peptides de Memb11 ou Memb12 avec Arf1-GTP (T) ou Arf1-GDP (D). Les pistes ArfA1c et Memb11 correspondent aux peptides purifiés. Les Western-blots ont été réalisés avec l'anti-Memb11 puis avec l'anti-Arf1. Le rectangle rouge entoure Memb11 et Memb12 et le rectangle violet, Arf1. La bande à 50 Kda correspond aux chaînes lourdes des IgG.

mais Memb11 possède deux séquences de 3 acides aminés en supplément dans le premier et le deuxième coude. Ces zones sont fortement accessibles pour une interaction. De plus les acides aminés K²⁵, D²⁸ et R³² de la première hélice α de Memb11 remplacés par R²², N²⁵ et K²⁹ dans la séquence de Memb12 sont exposés vers l'extérieur de l'hélice et sont aussi à l'extérieur de la structure 3D de la protéine. Ces trois zones sont donc des sites potentiels pour une interaction avec Arf1. Ces informations m'ont permis de réaliser des mutants au niveau du domaine N-terminal de ces protéines. Le premier test de BiFC avec les mutants suggère que l'interaction nécessite le début du domaine N-terminal (entre les acides aminés 1 à 44) mais cela doit être confirmé avant publication.

Pour appuyer les observations réalisées *in vivo* en BiFC j'ai réalisé des tests d'immunoprécipitations sur des mélanges de peptides de Memb11 ou Memb12 (les mêmes que ceux utilisés pour faire le test ELISA) avec Arf1 produits *in vitro* (Fig. III-1). Ne sachant pas si l'interaction se fait avec la forme GDP ou GTP d'Arf1, j'ai décidé de tester les deux formes. Pour plus de stabilité, j'ai utilisé les mutants Arf1^{T31N} et Arf1^{Q71L} qui restent respectivement bloqués sous forme GDP et GTP. Nous pouvons alors observer que Memb11 interagit avec les deux formes mais préférentiellement avec Arf1-GTP. De façon surprenante, Memb12 interagit elle aussi avec Arf1 et à l'inverse de Memb11, plutôt avec Arf1-GDP. Ces résultats sont inattendus étant donné que le BiFC montre une interaction seulement entre Memb11 et Arf1. Cependant cela nous donne l'information que ces deux protéines peuvent interagir directement *in vitro*. Ces résultats restent néanmoins préliminaires et doivent être confirmés.

Il faut cependant garder à l'esprit que les peptides ont été synthétisés *in vitro* avec des protéines bactériennes et donc que la conformation des peptides n'est peut-être pas la même que lors d'une synthèse eucaryote. La spécificité de l'interaction peut impliquer un aspect structural. Pour cela il serait possible d'utiliser le système d'expression *in vitro* utilisant les protéines extraites des cellules de germes de blé.

Une autre hypothèse serait que l'interaction entre Memb11 ou Memb12 et Arf1 soit régulée par d'autres partenaires ce qui entraînerait une spécificité d'interaction. Pour tester cela il serait envisageable de faire des études de split-ubiquitine ou des immunoprécipitations dans des levures surexprimant Memb11 ou Memb12 et Arf1. Sachant que la surexpression de Memb11 est toxique chez les plantes en induisant une diminution de la voie sécrétoire à un stade précoce (Chatre et al., 2005), j'ai testé la viabilité des levures *S. cerevisiae* surexprimant Memb11. J'ai

constaté que la surexpression avec un promoteur fort n'affecte pas la viabilité des levures. Ce type d'expérience est donc réalisable.

En ce qui concerne la question de la forme GDP ou GTP d'Arf1, il est possible de réaliser les études de BiFC sur cotylédons d'*A. thaliana* entre Memb11 ou Memb12 et les formes Arf1^{Q71L} (Arf1 bloquée sous forme GTP) et Arf1^{T31N} (Arf1 bloquée sous forme GDP). Nous pourrions alors confirmer *in vivo* sous quelle forme Arf1 interagit avec Memb11 et éventuellement Memb12, et ainsi élaborer un modèle sur les différentes étapes de l'interaction d'Arf1 avec la membrane du Golgi.

III.2 Discussion et perspectives à plus long terme

Il a été montré chez l'homme que le domaine cytoplasmique de la protéine p23 (de la famille des récepteurs p24) interagit avec une zone de 22 acides aminés en C-terminal d'Arf1-GDP (Gommel et al., 2001). De plus cette interaction a récemment été observée par des études de cristallographie (Zheng et al., 2013). Il a également été observé chez l'animal, que la séquence ¹¹⁰MXXE¹¹³ d'Arf1-GDP est une séquence critique pour sa localisation au niveau de l'appareil de Golgi et son interaction avec Membrine (Honda et al., 2005). Ces deux séquences distantes de 46 acides aminés définissent deux zones sur Arf1-GDP pour l'interaction avec plusieurs effecteurs. Chez *A. thaliana*, la séquence ¹¹⁰MXXE¹¹³ a également été démontrée comme nécessaire au recrutement d'Arf1-GDP à la membrane *cis*-golgienne (Matheson et al., 2008) Cela pourrait suggérer que la séquence d'Arf1 avec laquelle interagit Memb11 serait ¹¹⁰MXXE¹¹³ chez *A. thaliana*.

De plus la forme qui semble plutôt interagir avec Memb11 serait Arf1-GTP à la différence de la forme GDP pour Membrine chez l'animal. Bien que ce serait la forme GDP d'Arf1 qui interagirait aussi avec p23 chez l'animal, on pourrait tout de même émettre l'hypothèse que chez *A. thaliana* p23 recrute Arf1-GDP à la membrane et qu'ensuite Memb11 stabiliserait Arf1, sous sa forme GTP, active pour le recrutement de la machinerie COPI. Cette hypothèse pose la question de la présence possible de Memb11 dans les vésicules COPI.

D'autre part, Min *et al.* en 2012 ont montré chez *A. thaliana* que les Arf-GAPs Agd8 et Agd9 (protéines solubles) auraient un rôle critique dans le ciblage d'Arf1-GDP à la membrane de l'appareil Golgi. Ce ne serait donc qu'ensuite que p23 (et/ou Memb11) agirait comme « récepteur » à la membrane pour son activation en Arf1-GTP que stabiliserait plutôt Memb11.

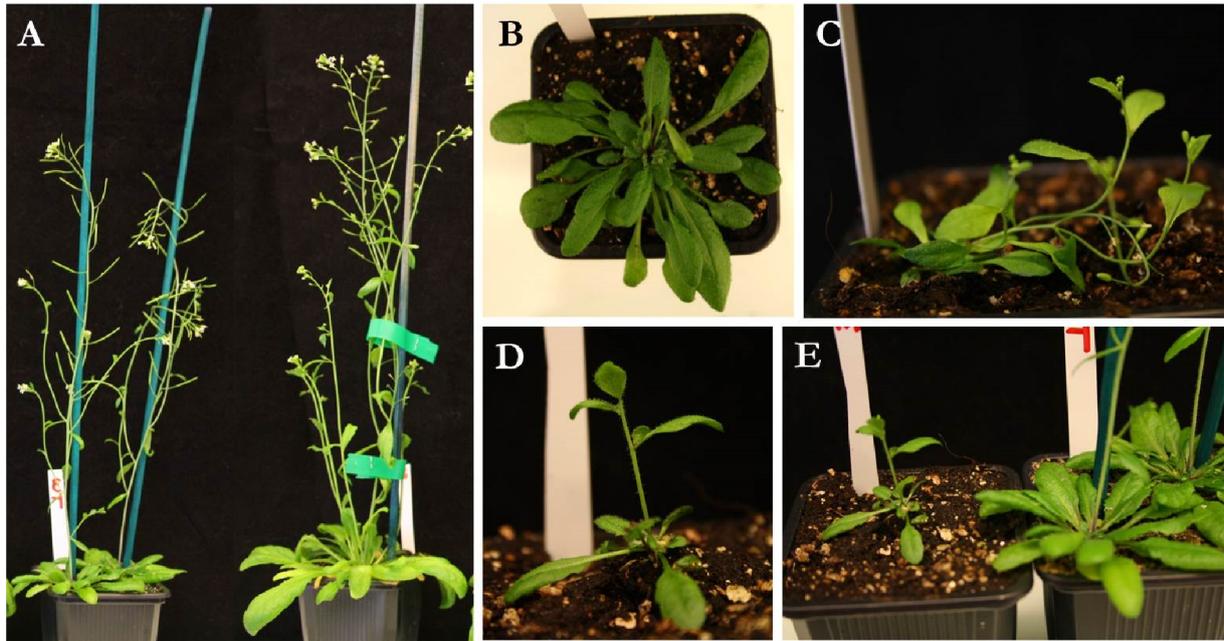


Figure III-2 : Photographies de quelques plantes « amiRNA » de Memb11 en F1 présentant des phénotypes variés. A) comparaison de plantes sauvages à gauche et d'une plante mutante à droite. La plante mutante possède des feuilles de rosette beaucoup plus grosses et des hampes florales plus fournies que les deux plantes sauvages. B) Plante mutante présentant une rosette trop fournie et une phyllotaxie désordonnée. C-D-E) Plante ayant un phénotype de nanisme, les feuilles sont très petites, la hampe florale est très fine (C) ou très courte et ne présente aucun bouquet floral (D-E). En (E) il est possible de comparer la plante mutante (à gauche) avec des plantes sauvages (à droite).

Pour aborder ces points, des essais d'interactions de p23 avec *Arf1 in vivo* sont nécessaires ainsi que l'utilisation des mutants *Agd8* et *Agd9* pour déterminer si l'interaction d'*Arf1* avec *Memb11* est abolie ou pas dans ces mutants.

Pour réaliser des études phénotypiques sur la fonction de *Memb11*, les seuls mutants disponibles possèdent des insertions dans les régions 5' et 3' UTR. J'ai alors décidé de faire des mutants en utilisant la technique des micros ARNs artificiels (*amiRNA*). J'ai obtenu la première génération de plantes (F1) mais il reste à quantifier le taux de transcrits de *Memb11* par qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction). Cependant, j'ai déjà observé quelques phénotypes intéressants (Fig. III-2). Bien que de nombreuses plantes aient un phénotype sauvage, il se trouve que certaines sont touchées par un phénomène de nanisme : feuilles de la rosette très petites (2 voire 1 cm), hampe florale fine, peu de feuilles caulinées et petit bouquet floral. D'autres plantes ont une croissance anarchique où la phyllotaxie n'est pas respectée avec des feuilles de rosette très développées (jusqu'à 10 cm) et trop nombreuses. Les hampes florales de ces plantes sont plus longues et plus épaisses. Le bouquet floral quant à lui ne semble pas différent. Par contre certaines plantes n'ont pas fait de hampe florale et je n'ai donc pas pu récupérer de descendance. Toutes ces plantes vont être génotypées afin de corréliser les phénotypes avec les niveaux d'expression.

Une complémentation fonctionnelle devra ensuite être réalisée en faisant exprimer dans les plantes « *amiRNA* » la protéine *Memb11*. Pour cela, il est nécessaire de réintroduire la séquence du gène avec des mutations silencieuses au niveau de la séquence ciblée par le micro ARN artificiel.

Lors de la quantification du niveau de transcrit de *Memb11* par qPCR, il faudra aussi vérifier le niveau de *Memb12* car il est possible que ce dernier puisse compléter en partie la perte de *Memb11* (phénotype sauvage).

J'ai aussi réalisé des mutants « *amiRNA* » de *Memb12*, mais ceux-ci n'ont pas le même éventail de phénotypes que *Memb11*. Je n'ai observé que des phénotypes sauvages et « anarchiques » semblables aux plantes « *amiRNA* » de *Memb11*.

C'est pourquoi j'ai aussi voulu créer une lignée double mutante avec des « *amiRNA* » dirigés contre les séquences de *Memb11* et *Memb12*. Cependant je n'ai obtenu aucune plante

exprimant l'« amiRNA ». Est-ce dû à une mauvaise transformation des plantes ou à un effet létal de la diminution simultanée de la quantité de Memb11 et de Memb12 ?

Pour ces deux mutants, les mêmes vérifications que pour les plantes possédant l'« amiRNA » de Memb11 sont à prévoir.

En ce qui concerne Memb12, très peu de choses sont connues. Elle est localisée au niveau de l'appareil de Golgi lorsqu'elle est surexprimée de façon transitoire dans des protoplastes (Uemura et al., 2004) ou de façon stable (Geldner et al., 2009) chez *A. thaliana*. Les études d'immunolocalisations réalisées avec l'anti-Memb11 marquent les saccules *cis*-golgiens mais cette localisation semble plutôt correspondre à celle de Memb11 vu l'efficacité de l'anticorps (test ELISA) et les données de transcriptomique (genevestigator). En ce qui concerne son rôle, il a été observé que l'ARN de Memb12 est la cible d'un « miRNA* » qui va diminuer la traduction de la protéine lors d'une attaque pathogène (*Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*). Cette diminution a pour effet d'augmenter l'exocytose de la protéine PR1 (protéine de défense de la plante) (Zhang et al., 2011). Cette observation indique-t-elle qu'il existe une voie de sécrétion particulière pour PR1 ou que Memb12 serait un régulateur de l'exocytose selon par exemple le concept iSNARE (Di Sansebastiano, 2013).

Une autre question se pose quant à la fonction de Memb11 chez *A. thaliana*. Chatre *et al.* en 2005, ont montré que la surexpression de Memb11 engendrait un blocage de la sécrétion et la relocalisation de marqueurs golgiens dans le RE. Ils en avaient déduit que Memb11 était importante pour le transport antérograde en tant que SNARE. Cependant, en 2006, les mêmes équipes ont montré que les voies antérograde et rétrograde entre le RE et l'appareil de Golgi étaient couplées (Stefano et al., 2006). Donc si la voie rétrograde (COPI) est bloquée, la voie antérograde (COPII) l'est aussi. Le blocage de la voie antérograde résultant de la surexpression de Memb11 pourrait être une conséquence directe du rôle de SNARE de la protéine Memb11 ou aussi être une conséquence indirecte de la titration d'Arf1 par Memb11. Etant donné qu'aucun complexe SNARE n'a été caractérisé à l'interface RE-appareil de Golgi, il est impossible de savoir si Memb11 est la Qb-SNARE du complexe *cis*-golgien. Memb11 a-t-elle une fonction de SNARE, de « régulateur » d'Arf1 ou bien les deux ?

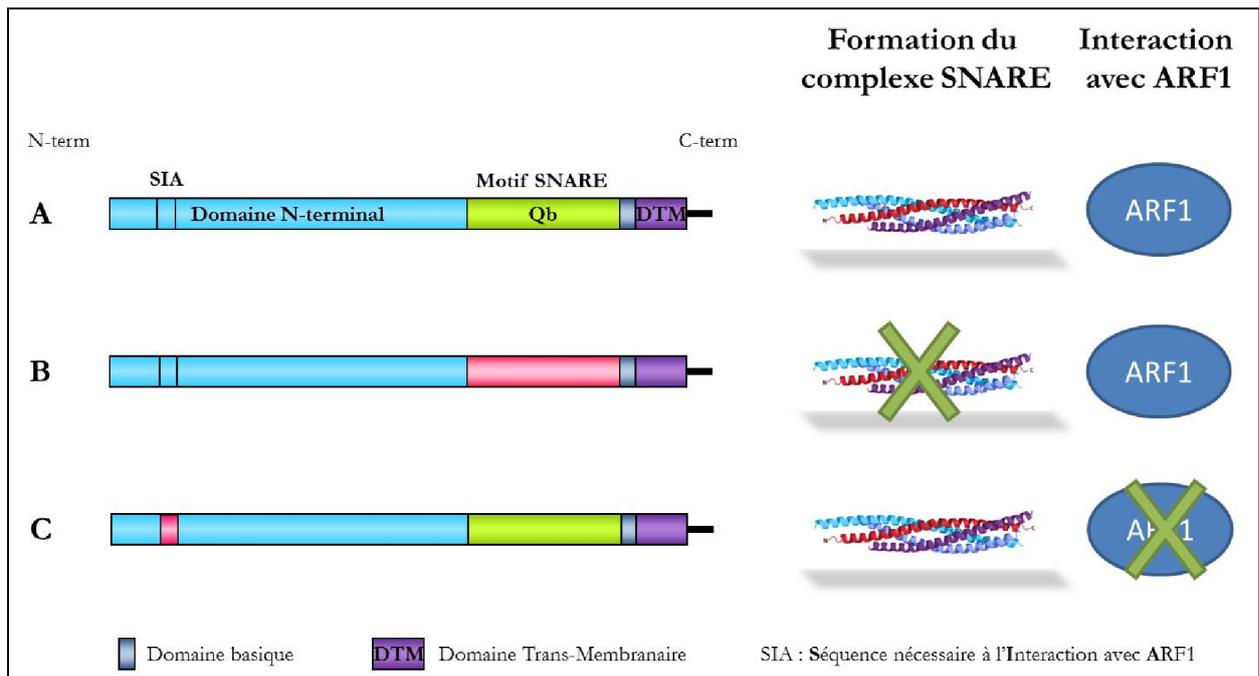


Figure III-3 : Représentation des mutations de Memb11 à réaliser pour vérifier la fonction de Memb11. A) protéine Memb11 normale ayant le domaine SNARE et la Séquence nécessaire à l'interaction avec Arf1 (SIA). B) protéine Memb11 ne possédant plus de domaine SNARE. C) Protéine Memb11 ayant toujours le domaine SNARE mais n'ayant plus la région SIA.

Pour répondre à cette question il serait possible d'utiliser les plantes mutantes « amiRNA » de Memb11 et de compléter la mutation avec des protéines Memb11 modifiées. Pour vérifier l'implication de Memb11 dans le complexe SNARE il faudrait exprimer une protéine ne possédant plus le domaine SNARE fonctionnel. D'un autre côté, pour le rôle de « Régulateur » d'Arf1, l'expression d'un mutant Memb11 ne possédant plus la Séquence nécessaire à l'Interaction avec Arf1 (SIA) devra être effectuée (Fig. III.3).

Communication Orale

Marais C., Maneta-Peyret L., Brocard L., Hocquelet A., Traineau J., Dupuis JW., Wattlelet-Boyer V., Satiat-Jeunemaitre B., Boutté Y. and Moreau P.

The ER-Golgi SNARE Memb11: also a receptor for the COPI-GTPase ARF1?

15th European Network for Plant Endomembrane Research (ENPER) meeting - 29-31 Août 2012, Madrid, Espagne.

IV MATERIEL ET METHODES

IV.1 Matériel biologique

IV.1.A Matériel végétal et conditions de culture

Les lignées d'*Arabidopsis thaliana* utilisées sont de l'écotype Columbia-0 (Col-0).

Plusieurs lignées d'*A. thaliana* exprimant différentes protéines marquées avec un fluorochrome, ont été utilisées lors de ce travail. Ces lignées sont les suivantes :

-P35S::Memb11-YFP (Melser S. (LBM, UMR5200), Bellec Y. et Gissot L. (IJPB, UMR1318)) : marqueur de l'appareil de Golgi.

-pUBQ10::Memb12-YFP (Geldner et al., 2009) : marqueur de l'appareil de Golgi.

-pSYP61 ::SYP61-CFP (Robert et al., 2008) : marqueur du TGN (*Trans Golgi Network*).

-P35S :: ST-mRFP (Viotti et al., 2010) : marqueur de l'appareil de Golgi plutôt *trans-golgien*.

IV.1.A.a Stérilisation des graines

Les graines d'*Arabidopsis thaliana* sont stérilisées en surface par immersion dans une solution à 3,2% (v/v) de chlore actif pendant 10 à 15 minutes puis elles sont rincées six fois dans de l'eau stérile.

IV.1.A.b Milieux et conditions de culture

Pour les plantes en terre, les graines ne sont pas stérilisées et sont mises directement sur la terre humide. Un dôme plastique est placé pendant deux semaines sur les pots afin de maintenir une humidité élevée.

Afin de récolter des graines, les plantes sèches sont frottées au-dessus d'une feuille pour ouvrir les siliques et obtenir les graines. Elles sont ensuite tamisées et stockées dans de petits sachets en papier annotés.

Expérience	Type de culture	Contenant	Milieu de culture	Condition de culture	Luminosité en $\mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{sec}^{-1}$	Récolte
BIFC	<i>In vitro</i> solide	Boîte 6 puits	<ul style="list-style-type: none"> • MS 4.4g/L • MES 0.5g/L • Saccharose 10g/L • pH 5.7 • Agar plante 7g/L 	Photopériode 16h/8h (jours/nuite). 22°C/20°C. Hygrométrie 40%	160	7 jours
Divers	<i>In vitro</i> solide	Boîte de Pétri Carré (12x12cm)	<ul style="list-style-type: none"> • MS 2.15g/L • Glucose 20g/L • MES 3.91g/L • pH 5.7 • 110°C-30min 		90	15 jours
Immunoprécipitation	<i>In vitro</i> hydroponie	Bouteille 250ml	<ul style="list-style-type: none"> • 2/3 terreau agrophino • 1/3 Vermiculite 		20	15 jours
Culture plante pour graine, transformation stable, extraction ARN ou ADN, ...	Terre	pot	<ul style="list-style-type: none"> • 2/3 terreau agrophino • 1/3 Vermiculite 	Photopériode 16h/8h (jour/nuite). 22°C Hygrométrie 30%	100	6-7 semaines pour obtenir des graines

Tableau 1 : Conditions de culture des plantes

IV.1.B Souches bactériennes et milieux de culture.

Tous les clonages ont été réalisés dans la souche *Escherichia coli* DH5 α (F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17($r_K^- m_K^+$), λ). Pour certains, les vecteurs ont ensuite été insérés dans *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 qui possède le plasmide helper pMP90 (Koncz et al., 1992). Ce plasmide contient les gènes de virulence Vir permettant l'insertion d'un ADN de transfert (ADN-t) dans le noyau des cellules végétales pour les transformations transitoires et stables d'*Arabidopsis thaliana*.

Les bactéries ont été cultivées avec du milieu Luria-Bertani (LB) (Bactotryptone 1% (p/v), extrait de levure 0.5% (p/v), NaCl 1% (p/v)) contenant 1,5% (p/v) d'agar bactériologique pour les milieux solides. Ce milieu est autoclavé à 121°C pendant 20 minutes puis les antibiotiques adéquats sont ajoutés.

Les concentrations des antibiotiques utilisés sont présentées dans le tableau 2. Les solutions d'antibiotiques sont préparées dans de l'eau distillée, sont filtrées (0,2 μ m) sous la hotte et conservées à -20°C.

Les souches d'*E. coli* sont cultivées à 37°C et celles d'*A. tumefaciens* à 30°C.

Antibiotique	<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>
Ampicilline 100mg/ml	100µg/ml	100µg/ml
Gentamycine 20mg/ml	20µg/ml	20µg/ml
Kanamycine 50mg/ml	50µg/ml	50µg/ml
Spéctinomycine 50mg/ml	50µg/ml	100µg/ml

Tableau 2 : Concentration des antibiotiques pour les différents organismes

IV.2 Méthodes de biologie moléculaire.

Lors de l'utilisation de kits, les indications du fabricant sont suivies sauf indication contraire.

IV.2.A Extraction des acides nucléiques

IV.2.A.a Extraction des ARNs totaux d'*Arabidopsis thaliana*

Les tissus d'*A. thaliana* sont prélevés dans l'azote liquide et peuvent être stockés à -80°C avant d'en extraire les ARNs totaux. Les échantillons sont broyés dans de l'azote liquide avec un mortier et un pilon lorsque le nombre d'échantillons est inférieur à 5. Pour un nombre plus important (jusqu'à 48 échantillons à la fois) le Tissuelyser II (Quiagen) est utilisé avec des billes en acier inoxydable de 5mm.

Les ARNs totaux sont extraits des tissus à l'aide du kit « RNeasy Plant Mini Kit » (Quiagen). Puis, afin d'éviter la contamination des ARN totaux par de l'ADN génomique, ils sont traités avec la DNase I du kit DNA-free (Ambion). Il est aussi possible d'utiliser le kit « SV total RNA isolation System » (Promega). Dans ce dernier, une étape de traitement à la DNase I est déjà incluse.

La quantité et la qualité des ARNs totaux extraits sont déterminées par spectrophotométrie à 260 et 280 nm à l'aide d'un NanoDrop (Thermo).

IV.2.A.b Synthèse d'ADN complémentaire à partir d'ARN totaux par transcription inverse

La synthèse d'ADNc se fait avec le kit « SuperScript II Reverse Transcriptase » (Invitrogen) à partir de 1ng-5µg d'ARNt. La quantité d'ADNc est dosée au NanoDrop (Thermo) à 260nm.

IV.2.A.c Extraction de l'ADN génomique (ADNg) d'*Arabidopsis thaliana*.

L'ADN génomique est extrait selon la méthode d'Edwards et al. (1991). Un disque de feuille congelé dans l'azote liquide est broyé dans un tube eppendorf stérile avec un micro-pilon pendant 15 secondes. 400µl de tampon d'extraction (Tris-HCl 200mM pH7.5, NaCl 250mM, EDTA 25mM et SDS 0.5% (p/v)) sont ajoutés au broyat et le tout est vortexé 5 secondes. L'échantillon est laissé à température ambiante pendant 5 minutes avant d'être centrifugé à 17 900 g pendant 1 minute. 300µl de surnageant sont récupérés dans un tube stérile où est ajouté 1 volume d'isopropanol, soit 300µl. Après 2 minutes à température ambiante, l'échantillon est centrifugé à 17 900 g pendant 15 minutes. Le surnageant est éliminé, le culot est lavé avec 1ml d'éthanol à 70° et centrifugé une dernière fois à 17 900 g pendant 3 minutes. L'éthanol est ensuite enlevé et le culot est séché à l'air libre. L'ADN génomique est re-suspendu dans 100µl d'eau stérile puis dosé à l'aide d'un NanoDrop (Thermo) à 260nm.

IV.2.A.d Extraction d'ADN plasmidique d'*Escherichia coli* et d'*Agrobacterium tumefaciens*.

L'ADN plasmidique des bactéries est extrait à l'aide du kit « GenElutePlasmidMiniprep Kit » (Sigma) ou le « Plasmid Mini Kit » (Qiagen) pour une meilleure pureté. L'élution est faite dans 50µl d'eau stérile.

Pour réaliser des Midiprep afin d'obtenir plus de plasmide, le kit « Plasmid Midi Kit » (Qiagen) est utilisé.

IV.2.B Amplification d'acides nucléiques par PCR (Polymerase Chain Reaction)

Les PCRs de contrôles (vérification de la présence d'un gène après clonage, sélection des lignées de plantes, de bactéries ou de levures) sont réalisées avec la GoTaq polymérase (Promega).

Pour l'amplification de séquences en vue de clonage ou de séquençage, une polymérase haute-fidélité est utilisée : Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Finzime) ou Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (BioLabs).

Pour ces différentes PCRs les tampons adéquats sont utilisés et les différents temps et températures des cycles suivent les recommandations du fabricant. La température d'hybridation et le temps d'élongation sont à définir en fonction des couples d'amorces.

IV.2.C Electrophorèse des acides nucléiques

Les fragments d'acides nucléiques sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% ou 2% (p/v) pour des fragments de petite taille. Ce gel est composé d'agarose dissous dans une solution de TAE 0.5X (20mM Tris ; 10mM Acétate de sodium pH8.3 ; 0.5mM EDTA) puis additionné de 5% (v/v) de Bromure d'éthidium (BET) afin de visualiser les acides nucléiques sous UV.

Pour la migration, un tampon de charge 6X (Orange G 20mg ; Glycérol 100% 6ml ; EDTA 0.5M 1.2ml ; H₂O 2.8ml) est ajouté aux échantillons qui sont déposés dans les puits du gel. Un marqueur de taille (2-Log (BioLabs) ou 1KB (Promega)) est toujours déposé dans l'un des puits afin de pouvoir déterminer par analogie la taille et la concentration des échantillons.

La migration se fait à 100V dans du tampon TAE 0.5X. Puis le gel est observé sous UV avec l'appareil d'acquisition d'image Image Quant 300 (GE-Healthcare).

IV.2.D Purification d'un fragment de PCR

Afin de purifier les fragments d'ADN d'intérêt la PCR est séparée par électrophorèse. Lors de l'observation sous UV le fragment est découpé avec une lame de scalpel et purifié avec le kit «QIAquick PCR Purification Kit» (Qiagen) pour une élution dans 50µl d'eau stérile ou avec le kit «MinElute PCR Purification Kit» pour un volume d'élution de 10µl. Le fragment est alors pur et peut être utilisé pour réaliser un clonage.

IV.2.E Clonages

Tous les clonages réalisés au cours de ce travail ont été obtenus à partir d'ADNc. Les constructions obtenues ont été vérifiées par séquençage et par restriction.

IV.2.E.a Utilisation du système Gateway® d'Invitrogen

La technologie Gateway® est une méthode de clonage universelle basée sur les propriétés de recombinaison « site-spécifique » du bactériophage lambda. Elle permet le passage rapide et efficace d'un fragment d'ADN dans différents vecteurs, et ce, en maintenant l'orientation et le cadre de lecture. Premièrement le fragment est inséré dans le vecteur d'entrée puis il est transféré dans le vecteur de destination de notre choix. Pour les différents clonages Gateway®, deux vecteurs d'entrée ont été utilisés : pDONR221™ et pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen).

pDONR221™:

Il faut réaliser les PCRs des fragments à cloner avec des amorces spécifiques contenant les séquences attB1 et attB2 nécessaire à la recombinaison. Ces amorces étant longues, les PCR se font en deux étapes. Une PCR courte de 10 cycles sans phase d'élongation terminale est réalisée avec des amorces, spécifiques à la séquence à cloner, contenant une partie des séquences attB. Puis 10µl sont utilisés comme matrice pour une seconde PCR avec les amorces « adaptatrices » attB1 et attB2 complètes (Annexe 1) mais ne possédant pas d'affinité pour la séquence du gène. Les fragments sont ensuite purifiés et insérés dans le vecteur pDONR221™ grâce à l'ensemble d'enzymes contenu dans le « Gateway® BP clonase™ II Enzyme Mix » (Invitrogen). 1µl de Mix est ajouté à 50ng de pDONR221™ et à 3µl de fragment PCR (5-50ng). Le tout est laissé la nuit à 25°C puis la réaction est stoppée en ajoutant 1µl de solution de protéinase K (Invitrogen) et en

incubant 15 minutes à 37°C. La solution est gardée à 4°C avant de transformer les bactéries *E. coli* avec 1µl de la réaction. Ce vecteur confère aux bactéries la résistance à la kanamycine.

La recombinaison se fait entre les sites attB du fragment PCR et attP du vecteur. Après action de la « BP clonase® II » deux produits sont obtenus, le vecteur contenant le clone entouré des sites attL et un fragment d'ADN contenant la séquence initialement présente dans le vecteur entre les sites attP (Fig. IV-1).

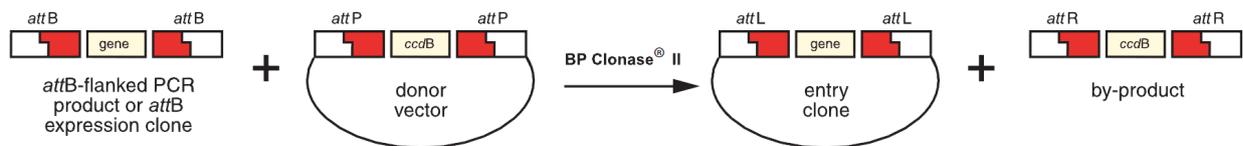


Figure IV-1 : schéma représentant l'événement de recombinaison induit par la "BP clonase® II"

pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen):

L'utilisation du vecteur pENTR™/D-TOPO® a pour avantage d'être plus rapide et nécessite des amorces PCR plus petites. Le vecteur possède déjà les sites attL et le clonage dans ce vecteur est permis par l'action de la Topoisomérase I. Il suffit d'amplifier la séquence d'ADN à cloner avec une amorce sens commençant par CACC suivi par la séquence spécifique au gène et une amorce anti-sens correspondant exclusivement à la séquence du gène. Après purification de ces fragments et quantification, un mélange réactionnel de 3µl est réalisé, contenant 0,5µl de solution saline diluée au ¼ avec de l'eau, 0,5µl de vecteur pENTR™/D-TOPO® (7,5-10ng) et le fragment PCR de manière à avoir un ratio molaire compris entre 0,5 :1 et 2 :1 (fragment PCR : vecteur pENTR™/D-TOPO®). La réaction se fait en 5 minutes à température ambiante puis la solution est gardée à 4°C avant de transformer les bactéries *E.coli* avec 1µl. Le reste de la réaction peut être conservé à -20°C pendant une nuit. Ce vecteur confère aux bactéries la résistance à la Kanamycine.

Passage du vecteur d'entrée au vecteur de destination :

Après séquençage de la séquence contenue dans le vecteur d'entrée, son passage dans le vecteur de destination se fait par une réaction appelée LR où se produit un évènement de

recombinaison entre les sites attL du vecteur d'entrée contenant le clone et les sites attR du vecteur de destination pour obtenir un clone d'expression avec les sites attB (Fig. IV-2). 50 à 150ng de vecteur d'entrée sont mélangés à 150ng de vecteur de destination et 1µl de Gateway® LR clonase® II enzyme mix, le tout n'excédant pas 4µl. Puis la réaction se fait sur la nuit à 25°C avant d'être arrêtée par 0,5µl de protéinase K qui est laissée agir 30 minutes à 37°C. La réaction est finalement gardée à 4°C avant d'en utiliser 1µl pour transformer des bactéries *E.coli*.

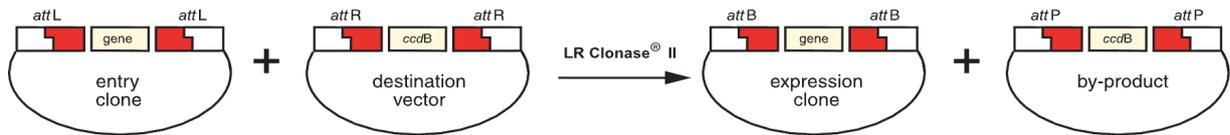


Figure IV-2 : Représentation schématique de la réaction induite par la "LR clonase® II"

Utilisation de la ligation pour insérer un gène d'intérêt dans un plasmide :

Pour cette méthode de clonage, le fragment PCR et le vecteur sont coupés par des enzymes dites de restriction qui génèrent des extrémités franches ou cohésives.

Les enzymes de restriction utilisées sont des Fast Digest (Thermo Scientific) qui permettent avec une unité de couper 200ng de fragment PCR ou 1µg d'ADN plasmidique. Pour un volume final de 20µl, 1µl de chaque enzyme de restriction (un pour une simple digestion et deux pour les doubles digestions) est ajouté à l'ADN (vecteur ou PCR) avec le tampon correspondant. La digestion se fait pendant 30 minutes à 37°C puis les fragments sont purifiés sur gel d'électrophorèse de la même manière que les fragments PCR (voir « Purification d'un fragment de PCR ») et élués dans 10µl d'eau.

L'extrémité 5'-P du vecteur est ensuite déphosphorylée pour éviter sa re-circularisation. Pour ce faire, il est traité avec la phosphatase alcaline d'intestin de veau (CIP, Biolabs). 1µl de CIP est ajouté aux 10µl de vecteur digérés avec 4µl de tampon NEBuffer (Biolabs) et 5µl d'eau. Après 30min d'incubation à 37°C, 1µl de CIP est de nouveau ajouté et le tout est incubé 30 minutes à 37°C avant d'être purifié sur une colonne du kit «MinElute PCR Purification Kit» (QiaGen) et élué dans 10µl d'eau.

La ligation des inserts est réalisée pendant la nuit à 16°C avec la ligase T4 (Promega, T4 DNA Ligase) qui catalyse la formation de ponts phospho-diester entre les extrémités 3'-OH et

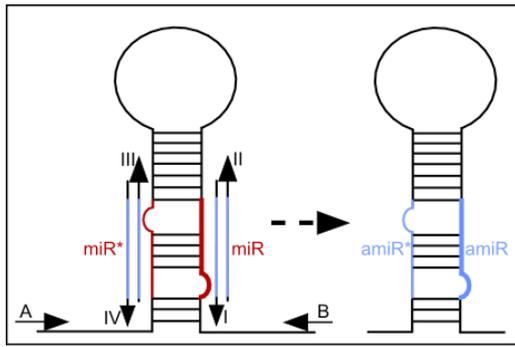
5'-P. La réaction est effectuée dans un volume final de 20µl, un ratio molaire de 3:1 (insert : vecteur) est nécessaire à la réaction avec 1 unité de T4 DNA ligase et 1X du tampon de la Ligase.

La ligation est gardée à -20°C et 5µl permettent de transformer 50µl de bactéries *E. coli*.

IV.2.F Création des micro-ARN artificiels (amiRNAs)

Les amiRNAs sont des ARNs simple brin de 21 nucléotides non présents naturellement chez *A. thaliana* et qui sont créés à partir d'un précurseur de micro ARN endogène. Les amorces spécifiques (Annexe 1) pour la réalisation des amiRNA contre la séquence codante de Memb11 ou de Memb12 ont été conçues par un outil bio-informatique en ligne dédiée : WMD2 (Web MicroRNA Designer; <http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>). Les amiRNA créés sont spécifiques de leur cible et possèdent trois critères essentiels des micro-ARNs : ils commencent par un U, ils possèdent une instabilité relative en 5' par rapport à leur amiRNA* (par exemple jusqu'à 4 mismatches dans cette région, mais jamais plus de 2 de rang) et le dixième nucléotide est soit un A soit un U. Pour la création d'amiRNA le précurseur utilisé est MIR319a. La séquence originale du miR319a est remplacée par la séquence de notre amiRNA et celle du miR319a* par une séquence artificielle remplissant les mêmes exigences qu'un miRNA*. Cette étape se fait par une succession de PCR, dont deux étapes de PCR chevauchantes (Fig. IV-3 a-b). La matrice utilisée est le plasmide pRS300 correspondant au vecteur pBSK dans lequel a été cloné MIR319a. Les amorces A et B s'hybrident sur la séquence du plasmide pRS300 et permettent de générer un produit de PCR contenant l'ensemble amiRNA et amiRNA* ainsi que le promoteur T7 et T3 (annexe carte des vecteurs).

La séquence de l'amorce A préconisée par WMD2 est rallongée avec CACC en 5' lors de la dernière PCR afin de permettre le clonage Gateway dans le vecteur d'entrée pENTR/D-TOPO. Puis la séquence permettant la création du micro ARN artificiel est insérée dans le vecteur binaire de destination pB2GW7. Ce vecteur confère la résistance à la spectinomycine pour les bactéries et au BASTA pour les plantes. Les bactéries *A. tumefaciens* sont ensuite transformées avec les différentes constructions afin d'obtenir des lignées d'*A. thaliana* stables par méthode de « floral dipping » (cf « Transformation stable par *Agrobacterium tumefaciens* avec la méthode du « floral dipping »). La sélection des plantules transformées se fait suivant la méthode décrite dans la section « Sélection des plantes transformées ».



a)

Etape PCR	Produit	Amorce sens	Amorce anti-sens	Matrice
1	(a)	A	II	pRS300
2	(b)	I	B	pRS300
3	(c)	A	B	(a)+(b)
4	(d)	A	IV	(c)
5	(e)	III	B	(c)
Finale	(f)	A (CACC)	B	(d)+(e)

b)

Figure IV-3 : Représentation schématique des étapes de PCR successives pour la construction des amiRNAs. a) Schéma du principe de substitution de la séquence de reconnaissance du miRNA endogène (miR) par le amiRNA (amiR). b) Tableau récapitulatif des étapes PCR nécessaires à la construction des amiRNAs.

IV.2.G Obtention des mutants Memb11 et Memb12

Différents mutants hybrides entre Memb11 et Memb12 (Fig. IV-4) ont été réalisés en se basant sur des résultats d'analyses structurales *in silico*. De plus, des mutants de la protéine G, ARFA1c ont été réalisés de manière à obtenir une protéine ARFA1c bloquée sous la forme GDP : ARF1^{T31N} et la forme GTP : ARF1^{Q71L}. Pour obtenir les séquences correspondant aux différents mutants, de nombreuses PCR chevauchantes ont été réalisées (Tableau 3 et Fig. IV-5). Ces séquences ont été obtenues avec des amorces possédant les séquences attB1 et attB2 permettant le clonage Gateway dans le vecteur d'entrée : pDONR221.

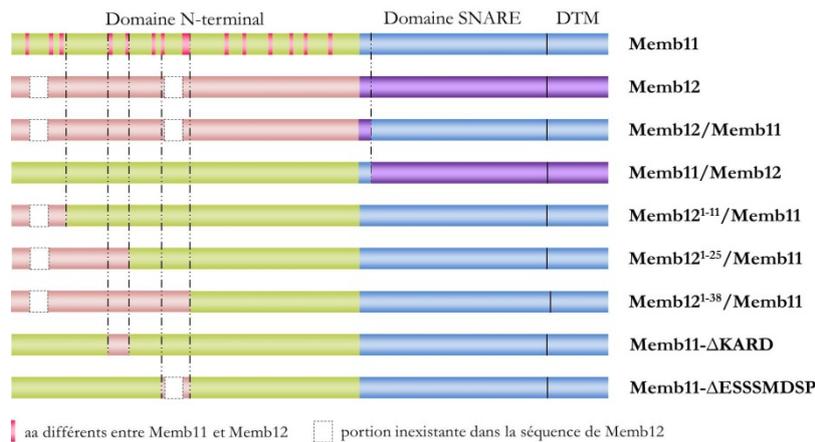


Figure IV-4: Représentation schématique des séquences d'ADN des différents mutants Memb11-Memb12

Etape PCR	Produit	Amorce sens	Amorce anti-sens	Matrice
1	(a)	attB1	II	Matrice 1
2	(b)	I	attB2	Matrice 2
finale	(c)	attB1	attB2	(a)+(b)

Tableau 3: Etapes de PCR nécessaires à l'obtention des séquences correspondant aux protéines mutantes

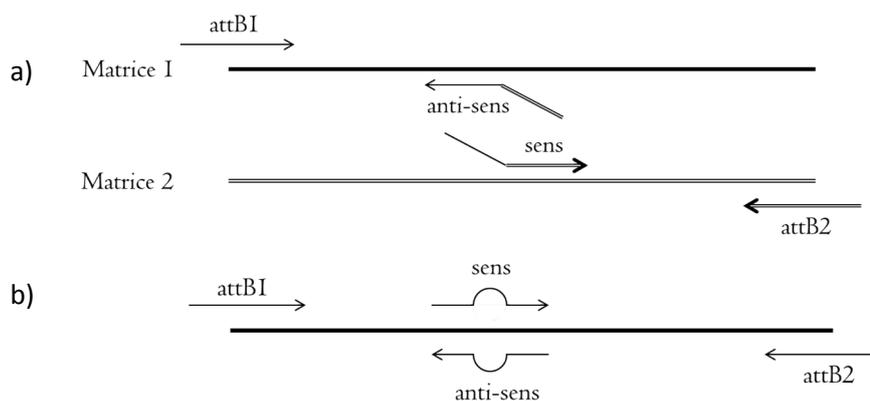


Figure IV-5 : Stratégies des différentes PCR chevauchantes. a) Utilisation de deux matrices afin d'obtenir des séquences hybrides (Memb11-Memb12 et Memb12- Memb11). b) Utilisation d'une seule matrice avec substitution d'une partie des nucléotides contenus au niveau de l'hybridation partielle des amorces sens et anti-sens (Δ KARD, Δ ESSMSPD, Arf1).

IV.3 Expression *in-vitro*

Pour l'expression *in vitro*, les différents gènes ont été insérés dans le vecteur pIVEX2.3 (Roche) qui est un vecteur d'expression bactérien. Il permet d'ajouter une étiquette poly-histidine en C-terminal de la protéine.

Le clonage se fait par ligation en utilisant comme enzyme de restriction : NcoI et SmaI. Il est donc important d'insérer les sites de restriction correspondant dans les amorces qui vont servir à l'amplification des séquences nucléotidiques (Annexe 1).

Pour la synthèse des protéines SNAREs : Memb11, Memb12, tous les mutants hybrides Memb11/12, la séquence de chaque gène a été amputée de la séquence codant le domaine transmembranaire car ce dernier, très hydrophobe, rend plus difficile la synthèse de protéine *in vitro*. Par contre en ce qui concerne ArfA1c, Arf1-GDP et Arf1-GTP la séquence entière a été clonée. Les PCR ont été réalisées en prenant comme matrice les constructions existantes dans le vecteur d'entrée pDONR221™.

Après clonage des séquences dans le vecteur pIVEX2.3, une midi-prep est réalisée afin d'obtenir une quantité de plasmide importante car il faut 1,5 µg d'ADN pour réaliser un essai.

Système RTS (Rapid Translation System): (Fig. IV-6)

Il faut réaliser un milieu composé de 0.05% NaN₃, 2% de PEG 8000, 150.8mM d'acétate de potassium, 7.1mM de Mg(OAc)₂, 0.1M d'HEPES, 1X d'anti-protéases (complete EDTA-free de chez Roche), 0.1mg/ml d'acide folique, 2mM de DTT (dithiothréitol), 1X de mélange de NTP (nucléotides triphosphate), 20mM de PEP (phosphoenolpyruvate), 20 mM d'acétyle phosphate, 0.5mM d'un mélange d'acides aminés complet et 1M d'un mélange restreint d'acides aminés (RCWMDE). Ce milieu va servir à réaliser le milieu nutritif et le milieu réactionnel. Le milieu nutritif contient en plus 35% d'un Tampon S30. Le milieu réactionnel quant à lui est composé du mélange initial additionné de 0.4mg/ml de pyruvate kinase, 1.2mg/ml d'ARNt, 1.4 Unité/µl de la T7RNAPolymérase et 35% d'un extrait S30 de bactéries (extrait d'*E. coli* sans l'ADN et les ARN). La transcription est réalisée par la polymérase du bactériophage T7 car ça permet d'éviter de transcrire d'éventuels gènes bactériens non éliminés lors de la préparation de l'extrait S30. Dans le milieu réactionnel est rajouté 1.5µg du plasmide contenant la séquence codant pour le peptide.

100µl de mélange réactionnel sont déposés dans le bouchon d'un tube de 1.5ml, puis une membrane de dialyse (limite d'exclusion de 10KDa) est déposée dessus. Le reste du tube est ajouté sur le bouchon. L'extrémité du tube est coupée et 1.7ml de mélange nutritif est ajouté dans le tube. Le fait de séparer le mélange nutritif contenant les co-facteurs, les acides aminés, les tampons et d'autres composants du milieu réactionnel par une membrane de dialyse permet la sortie des molécules déchets mais laisse entrer les composants permettant à la réaction de s'effectuer. Cette séparation optimise la réaction de synthèse.

Le tube est mis bouchon vers le bas dans un incubateur à 28°C, pendant 22h avec une agitation de 50rpm. Le lendemain le mélange nutritif est enlevé puis les peptides néo-synthétisés sont récupérés en perçant la membrane de dialyse et en aspirant le mélange réactionnel avec le cône d'une pipette.

Les peptides doivent ensuite être purifiés.

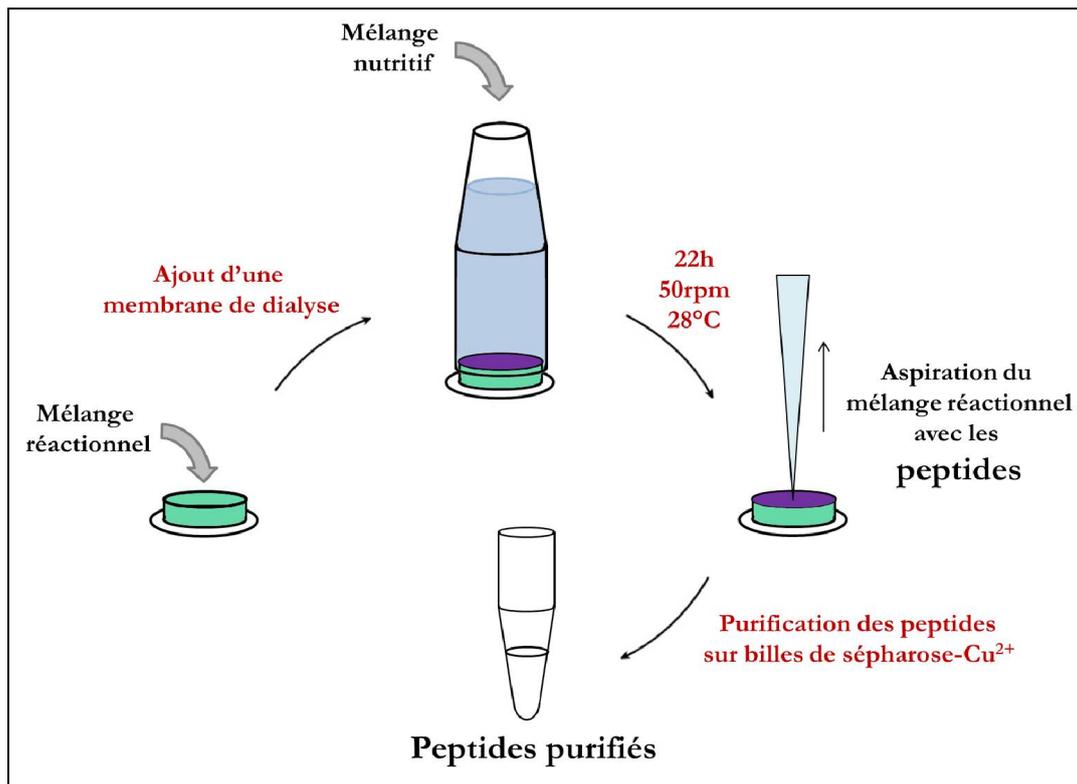


Figure IV-6 : Etapes de synthèse et de purification des peptides *in vitro*.

Purification des peptides sur IMAC Sepharose™ 6 fast flow (GE Healthcare) :

Les peptides obtenus possèdent une étiquette 6[His] ce qui permet de les purifier.

J'ai utilisé 100µl de gel IMAC Sepharose 6 pour chaque échantillon de peptide à purifier. Le traitement est effectué dans des tubes Eppendorf (les lavages et traitements ultérieurs se font par prélèvement du surnageant après centrifugation 1 seconde sur mini centrifugeuse de paillasse).

Préparation : le gel est lavé avec 2x500µl H₂O. 20µl d'une solution de CuSO₄ 0.2M sont ajoutés. Le gel est lavé avec 2x500µl H₂O puis équilibré avec 3x500µl de tampon PNI: 20 mM phosphate, 0.5M NaCl, 5mM Imidazole, pH 7.4. Les échantillons à purifier (100µl du mélange réactionnel décrit ci-dessus) sont dilués avec 800µl de tampon PNI et ajoutés dans les tubes contenant le gel. Après 5 min d'incubation le gel est lavé avec 3x1ml de tampon PNI.

L'éluotion est réalisée avec 100µl de tampon PNI contenant 500mM Imidazole ce qui a permis de récupérer environ 100µl d'éluât (peptides purifiés). La concentration en protéines a été dosée pour chaque éluât.

IV.4 Transformation du matériel vivant

IV.4.A Préparation de bactéries pour transformation par électroporation

Pour *E. coli* le protocole suivi se trouve en Annexe. Les bactéries compétentes sont ensuite conservées à -80°C.

Pour *A. tumefaciens*, 2ml de culture de bactéries dans du LB avec de la gentamycine sont utilisés. Après 16h à 30°C sous agitation, la culture est centrifugée à 17 000 g pendant 1 minute puis le culot est repris dans 1ml d'eau stérile. Trois nouvelles centrifugations (17 000g/1min) sont réalisées et le culot est repris successivement dans 500µl, 250µl et 200µl d'eau stérile. La transformation par électroporation se fait ensuite avec 50µl de cellules compétentes.

Les transformations se font dans des cuves d'électroporation ayant les électrodes séparées d'1mm. Les cuves sont refroidies dans la glace puis remplies avec 50µl de cellules électro-compétentes mélangées avec 1µl de plasmide (sauf indication contraire). Les cuves sont placées dans l'électroporateur MicroPulseur (Biorad) où un courant électrique de 1,8kV est appliqué. Les cellules sont ensuite mises dans 1ml de milieu LB et incubées pendant 1h à 37°C pour *E. coli* et 2h à 30°C pour *A. tumefaciens*. Les bactéries sont centrifugées pendant 3 minutes à 5000g, puis le culot est étalé sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB avec l'antibiotique de sélection. Les boîtes sont ensuite mises dans les incubateurs à 37°C pendant la nuit pour les *E. coli* et à 30°C pendant 48h pour les *A. tumefaciens*.

IV.4.B Stockage et conservation des souches de bactéries

Les bactéries sont mises à pousser toute la nuit sous agitation dans 2ml de milieu de culture liquide (LB avec antibiotique) à la température adéquate. 1ml de cette culture est mélangé dans un cryo-tube correctement annoté avec 250µl de Glycérol 100% autoclavé. La culture est mélangée juste avant de mettre le cryo-tube à -80°C.

IV.4.C Méthode de transformation d'*Arabidopsis thaliana*

Transformation stable par *Agrobacterium tumefaciens* avec la méthode du « floral dipping »

Les transformations stables d'*Arabidopsis thaliana* sont réalisées par « Floral dipping » (Clough and Bent, 1998). Une pré-culture de 15ml (LB-antibiotique) d'*A. tumefaciens* contenant la construction d'intérêt est réalisée sur la nuit à 30°C sous agitation (200rpm). Le lendemain matin la pré-culture est ajoutée à un volume de 200ml de LB-antibiotique de manière à obtenir une densité optique à 600nm (DO_{600nm}) de 0,35. Cette culture est mise à 30°C sous agitation jusqu'à obtenir une DO_{600nm} de 0,7nm. La culture est ensuite centrifugée à 4000g pendant 15 minutes à température ambiante et les culots bactériens sont repris dans 200ml de solution d'infiltration (Saccharose 5% (p/v), Silwett L77 0.05% (v/v)). Les hampes florales sont trempées dans la solution d'infiltration 1 minute puis 30 secondes. Les plantes sont alors tuteurées et un sachet plastique est placé au-dessus des pots afin de garder un taux d'humidité élevé autour des fleurs. Les sachets sont enlevés après 24h et les plantes sont cultivées jusqu'à obtention de graines.

Sélection des plantes transformées

Les vecteurs utilisés pour la transformation conférant la résistance au BASTA, les graines récoltées après transformation des plantes sont semées en terre dans des plateaux et sont aspergées d'une solution de BASTA (150mg/l) 15 jours après germination. Les plantes sont ensuite traitées trois fois à deux jours d'intervalle. Les plantes ayant survécu sont repiquées dans des pots individuels et cultivées jusqu'à obtention de graines.

Transformation pour l'expression transitoire

La transformation des plantes d'*Arabidopsis thaliana* se fait sur de jeunes pousses de 4 jours afin de transformer les cotylédons. Le protocole est celui de Marion et al. (2008) sauf quelques modifications. Les plantules d'écotype Col0 sont cultivées dans des plaques 6 puits avec une grille (toile nylon avec une maille de 500µm de chez « Fisher scientific ») sur le milieu (cf. milieu et condition de culture). La grille permet de maintenir les plantules ancrées dans la gélose.

Une culture de 20ml (LB-antibiotique) d'*A. tumefaciens* contenant le vecteur d'expression est mise à incuber pendant 30 heures à 30°C sous agitation (200rpm) puis les cellules sont centrifugées à 3700g pendant 15 minutes à température ambiante et re-suspendues dans 2 ml de solution d'infiltration (MS 2.15g/l; glucose 20g/l; MES 3.91g/l; pH5.7, Acétosyringone 200µM). La densité optique à 600nm (DO_{600nm}) est mesurée puis la culture est diluée de manière à obtenir la DO_{600nm} désirée (0.3 à 0.5). Les plantes de 4 jours sont recouvertes par la solution d'*A. tumefaciens* et le vide est appliqué deux fois pendant 1 minute. La solution est ensuite aspirée et les plantes sont mises à pousser dans la chambre de culture pendant 48h avant d'être observées.

Une solution alternative à cette méthode de transformation par le vide est possible en ajoutant 0,05% (v/v) de Tween 20 à la solution d'infiltration et en laissant les plantes et les agrobactéries en co-culture pendant 40 minutes sous agitation. La solution est ensuite enlevée et les plantes sont mises dans la chambre de culture comme pour la première méthode.

IV.5 Méthode d'analyse des protéines

IV.5.A Purification d'anticorps polyclonaux

La purification des anticorps se fait sur colonne de chromatographie sépharose-protéines G (Sigma-Aldrich). La densité optique (DO) à 280nm en sortie de colonne est mesurée, cela permet de suivre la/les protéine(s) élué(s) de la colonne. La colonne est équilibrée avec un tampon phosphate 20mM pH7.4 puis 200µl de sérum dilués 10 fois dans le tampon phosphate sont chargés. Une augmentation de la courbe de DO est observée puis la colonne est rincée avec le même tampon jusqu'à ce que la DO retombe à la ligne de base. Les anticorps accrochés sur la protéine G sont ensuite élués en baissant le pH avec un tampon glycine 0,1M pH 2,7. L'éluât est suivi par la DO. L'acidité de cette solution contenant les anticorps est aussitôt neutralisée en ajoutant du tampon tris-base 1M pH 9 dans un rapport de 100/5 (v/v).

IV.5.B Test ELISA par compétition

Le test ELISA par compétition a été utilisé afin de vérifier la spécificité de l'anticorps anti-Memb11.

Compétition : Des dilutions de protéines (une série pour Memb11 et une série pour Memb12) entre 10^{-10} et 10^{-6} M dans du PBS (0.136 ml acide phosphorique, 1.8g NaCl, 200ml H₂O, pH 7.4) sont mélangées volume à volume avec les anticorps anti-Memb11 au 1/4000^{ième} (dans du PBS) et laissées une nuit à 4°C.

Coating : Une solution de Memb11 diluée à 4µg/ml (dans tampon carbonate 20mM pH 9.6) est déposée (100µl/puits) sur une plaque ELISA (Nunc). La plaque est laissée à 4°C 1 nuit.

Saturation : La plaque est vidée puis saturée avec une solution de BSA à 5µg/ml dans du tampon PBS-Tween (20mM Phosphate, 0.15M NaCl pH 7.4, Tween 20 0.05%), pendant 45min à 20°C.

Anticorps I : La plaque est rincée 1 fois avec du PBS-Tween puis les différentes dilutions d'anticorps et d'anticorps/protéines sont déposées dans les puits. La plaque est incubée pendant 1h30 à 20°C.

Anticorps II : La plaque est rincée 3 fois avec du PBS-Tween puis le conjugué anti-Immunoglobulines G-peroxydase (HRP : HorseRadish Peroxydase) (Biorad) au 1/25 000^{ième} est déposé et la plaque est incubée pendant 30min à 20°C.

Révélation : La plaque est rincée 3 fois avec du PBS-Tween puis la solution de révélation est déposée : ortho phenylene diamine (OPD) diluée à 1mg/ml dans du tampon citrate-phosphate (0.146g acide citrique, 0.91g Na₂HPO₄, 100ml H₂O, pH 5-5.2) où 1µl/ml de peroxyde d'hydrogène est ajouté. L'OPD est le substrat de la HRP. La plaque est laissée 10min à l'obscurité puis la réaction est arrêtée avec 50 µl d'acide sulfurique 4M. L'absorbance est lue à 490nm.

IV.5.C Extraction des protéines

L'extraction des protéines d'*A. thaliana* se fait à partir d'une quantité variable de matériel. Pour 1g de plantes 2ml de tampon HEPES (HEPES 50mM ; Acétate de potassium 10mM ; Chlorure de sodium 100mM ; EDTA 5mM ; Saccharose 400mM ; pH 6,5) plus antiprotéase (complete EDTA free de chez Roche, et 1mM PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride)) sont ajoutés. Le tout est broyé dans un Potter en verre dans la glace puis filtré avec du Miracloth. Le filtrat est ensuite centrifugé 4 minutes à 936g afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est récupéré et peut être conservé à -20°C.

IV.5.D Quantification

La mesure de la quantité de protéines se fait avec le kit «Quantipro BCA Assay Kit» (Sigma) utilisant l'acide bicinchonique (BCA). Les recommandations du fabricant sont suivies et les mesures sont prises avec le spectrophotomètre (V-630BIO de chez Jasco) à une longueur d'onde de 562nm. Afin de déterminer la quantité des protéines contenues dans les échantillons à doser, une gamme étalon d'albumine de sérum bovin (BSA) est utilisée.

IV.5.E Electrophorèse en conditions dénaturantes : SDS-PAGE (Sodium Dodécyl Sulfate - Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis).

L'électrophorèse en conditions dénaturantes permet de séparer les peptides uniquement selon leur taille en s'abrogeant de leur structure tridimensionnelle.

Les échantillons sont dénaturés en les mélangeant avec du tampon de charge 5X (Tris-HCl 200mM ; Glycérol 50% (v/v) ; Sodium DodecylSulfate (SDS) 5% (p/v) ; Dithiothreitol (DTI) 250mM ; Bleu de bromophénol 0.05% (p/v)) et en les chauffant pendant 10 minutes à 100°C.

Les échantillons (5 à 10µg de protéines) sont ensuite déposés sur un gel de polyacrylamide 12% (p/v). Celui-ci est constitué de 2 parties. Premièrement le gel de concentration (Tris-HCl 125mM ; pH 6,8 ; acrylamide : N,N'-méthylène bisacrylamide (29 :1) 4% (p/v) ; SDS 0,1% (p/v)) permet à toutes les molécules d'être concentrées au même niveau avant d'être séparées, ce qui contribue à une meilleure résolution. Puis le gel de séparation (Tris-HCl 375mM ; pH 8,8 ; acrylamide : N,N'-méthylène bisacrylamide (29 :1) 12% (p/v) ; SDS 0,1% (p/v)) qui permet de séparer les peptides. La polymérisation des gels est induite par l'ajout de 0,05% (v/v) de TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) et de 0,05% de persulfate d'ammonium.

L'électrophorèse se fait à voltage constant (200V) pendant environ 45 minutes dans un tampon d'électrophorèse (Tris-HCl 25mM ; pH8,3 ; Glycine 192 mM et SDS 0,1% (p/v)).

Après migration les protéines sont soit colorées au bleu de Coomassie (Bleu de Coomassie R250 0,04% (p/v) ; méthanol 45% (v/v) ; acide acétique 9% (v/v)) (1h puis décoloration une nuit avec 30% (v/v) d'éthanol et 5% (v/v) d'acide acétique) pour observation

directe, soit transférées sur une membrane de PVDF (Polyvinylidènefluorure) pour réaliser un Western Blot.

IV.5.F Analyse par spectrométrie de masse

Le gel coloré au Bleu de Coomassie est conservé à 4°C dans une solution contenant 1% d'acide acétique. Le gel est ensuite confié à la plateforme protéomique du Centre de Génomique Fonctionnelle de Bordeaux (CGFB) qui va analyser par spectrométrie de masse les différents peptides présents.

Les bandes de gel contenant les protéines sont découpées et les protéines sont digérées par une solution de trypsine, permettent d'obtenir des peptides pour l'analyse par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide. Les peptides sont ensuite séparés sur la colonne analytique, de 15 cm long et 75 µm de diamètre interne, remplie d'une phase stationnaire de type C18 (C18 PepMap™). La phase mobile A est une solution d'eau contenant 5% d'acétonitrile acidifiée par 0,1 % d'acide formique, la phase mobile B est une solution d'acétonitrile et d'eau (20/80 v/v) acidifiée par 0,1 % d'acide formique. L'éluion des peptides est réalisée à un débit de 200 nl/min par un gradient de 5 à 40 % de solvant B durant 35 minutes, le volume injecté est de 10µl. Les peptides sont ensuite analysés par spectrométrie de masse (MS/MS) sur un instrument LTQ(Linear Trap Quadrupole)-Orbitrap (Thermo).

L'acquisition des données est réalisée selon un programme de basculement automatique du mode MS au mode MS/MS. Le programme sélectionne les six peptides ayant les signaux les plus intenses afin de les fragmenter. Les données brutes sont ensuite utilisées pour interroger la banque de données « Arabidopsis thaliana Tair9 » téléchargée sur le site internet Arabidopsis.org et permettre ainsi de fournir une liste de protéines.

IV.5.G Western Blot

Les protéines contenues dans le gel de SDS-PAGE sont transférées sur une membrane de PVDF afin d'être par la suite marquées par des anticorps et révélées par chimiluminescence.

La membrane est trempée dans du méthanol quelques secondes puis rincée à l'eau stérile. Puis elle est mise dans le tampon de transfert (Tris base 25mM ; Glycine 192mM ; 8 volumes de

tampon pour 2 volumes d'éthanol) en attendant que la migration du gel se termine. Le transfert a lieu pendant 1h à 100V, à 4°C. Après transfert, la membrane est mise à saturer avec de la BSA 1% pendant une heure. (A partir de ce moment toutes les étapes se passent à température ambiante sous agitation et les solutions sont préparées dans du TBS (Trizma base 30% (p/v); NaCl80% (p/v) ; KCl2% (p/v) ; pH7,4 avec du HCl) -Tween 20 0,5% (v/v)). Après un bref rinçage de la membrane, l'anticorps primaire est ajouté et la membrane est incubée pendant 90 minutes puis rincée (15min puis 4 fois 5 minutes) avant d'appliquer l'anticorps secondaire (30 minutes). Une nouvelle série de rinçages identiques est réalisée avant de procéder à la révélation.

La révélation se fait avec le kit «Western Lightning Plus – ECL (enhanced chemiluminescence)» (PerkinElmer). Dans la chambre noire la membrane est incubée pendant une minute dans le mélange réactionnel puis est égouttée et est placée dans un film plastique. Un film auto-radiographique (CL-Xposure Film de chez Thermo Scientific) est placé sur la membrane pendant une durée variable. Ce film est développé par des bains de révélateur et fixateur.

Il est ensuite possible de réutiliser la même membrane pour faire un Western-blot avec un autre anticorps. Pour cela il faut enlever les anticorps primaire et secondaire présent sur la membrane avec une solution contenant 100mM de béta-Mercaptoethanol, 2% (p/v) de SDS et 62,5mM de Tris-HCl à pH6.7. La membrane est mise à incuber dans cette solution pendant 30 minutes à 50°C, puis elle est rincée avec la solution de TBS (Tris-buffered saline) -Tween 20 0,5%. Un nouveau Western-blot peut alors être effectué.

Anticorps	Anti-Memb11*	Anti-Sec22*	Anti-Arf1	Anti-GFP	Anti-Lapin couplé à la HRP
Fournisseur	LBM	LBM	Agrisera	Invitrogen	Biorad
Nature	Polyclonal	Polyclonal	Sérum	Polyclonal	Polyclonal
Origine	lapin	lapin	lapin	lapin	chèvre
Cible	Memb11, Memb12	Sec22	Arf1 végétales	GFP, CFP, YFP	IgG lapin
Dilution	1/4000	1/1000	1/1000	1/4000	1/50 000

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des anticorps utilisés lors des Western-blots. * : anticorps produits chez Covalab à partir de la protéine recombinante synthétisée et purifiée par Agnès Hocquellet (ESTBB). HRP : horse radish peroxydase.

IV.6 Méthodes d'analyse des interactions protéiques

IV.6.A Immunoprécipitation

L'immunoprécipitation est une technique permettant de piéger (à partir d'un homogénat ou une solution) avec un anticorps, une protéine et éventuellement ses inter-actants.

Lors des immunoprécipitations, des billes magnétiques (μ MACS™ de chez MiltenyiBiotec) couplées aux protéines A sont utilisées. Ces protéines ont la capacité de fixer les immunoglobulines (IgG) et chaque protéine permet de fixer deux molécules d'IgG.

Tout d'abord, il faut procéder de la même façon que pour l'extraction de protéines. Cependant, les protéines étudiées étant des SNAREs (protéines membranaires), il est important de solubiliser les membranes. Pour ce faire un détergent, Triton X100 ou Tween 20 à différentes concentrations, est ajouté à l'homogénat pendant une ou deux heures sous agitation à 4°C. La solution est ensuite centrifugée pendant 4 minutes à 3000 rpm et à 4°C afin d'éliminer les débris membranaires. 100 μ l de billes magnétiques, auxquelles les anticorps ont déjà été fixés (2-4 μ g d'anticorps polyclonaux purifiés), sont ensuite ajoutées au surnageant et le tout est laissé sous agitation à 4°C pendant deux heures. Ensuite, l'homogénat est passé à travers des colonnes sur un portoir aimanté, ce qui permet de fixer les billes dans la colonne. Pour finir, 70 μ l de tampon Laemmli chauffé à 95°C est ajouté afin de décrocher les IgG des billes et ainsi récupérer les complexes immuns. Cet échantillon est analysé par Western Blot et par spectrométrie de masse.

IV.6.B Immunoprécipitation sur les peptides synthétisés *in vitro*

La technique utilisée est proche de celle décrite précédemment. Cette méthode a été utilisée dans le cadre de l'étude d'interaction entre une SNARE (Memb11 ou Memb12) et une GTPase (ArfA1c). Cependant, les GTPases ne se retrouvant jamais sans GTP ou GDP *in vivo*, il a fallu charger ces protéines avec l'un ou l'autre des coenzymes.

Chargement des GTPase en GTP ou GDP :

Pour cela j'ai utilisé le protocole de Prouzet-Mauléon et al. publié en 2008. 10 μ M de peptides d'ARFA1c sont ajoutés à une solution de GDP ou de GTP (Tris-HCl 20mM, NaCl 25mM, DTT 0.1mM, EDTA 10mM, GDP ou GTP 25mM). Le mélange est mis à incuber

pendant 10 minutes à température ambiante puis la réaction est stoppée en ajoutant 36mM de Chlorure de magnésium glacé. La solution de peptides ArfA1c-GDP ou ArfA1c-GTP est ensuite gardée dans la glace.

Immunoprécipitation (IP):

Les immunoprécipitations ont été réalisées dans 900 µl tampon TBS (Trizma base 30% (p/v); NaCl80% (p/v); KCl2% (p/v); pH7,4 avec du HCl) plus antiprotéase (complete EDTA free de chez Roche et 1mM PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride)). 150 ng de peptides de Memb11 ou de Memb12 ont été mélangés avec 20 ng de peptides d'ARF1 chargé avec du GTP ou du GDP. Afin d'éviter la perte du coenzyme, 36mM de chlorure de magnésium sont ajoutés. Pour réaliser l'IP, 5µl d'anticorps anti-Memb11 (pour l'IP avec le peptide Memb11) ou 30µl (pour l'IP avec le peptide Memb12) sont mélangé à 100µl de billes. Le tout est mis sous agitation pendant 1h et la suite de l'expérience est réalisée de la même manière que l'IP « normale ».

IV.6.C Le BiFC : Bimolecular Fluorescence Complementation

Les études de BiFC permettent la visualisation directe de l'interaction de protéines dans des cellules vivantes.

Un fluorochrome est séparé en deux fragments, ce qui conduit à perdre toute émission de fluorescence. Chaque fragment est couplé à une des protéines à tester et s'il y a interaction entre les deux partenaires protéiques et que c'est compatible avec une reconstitution du fluorochrome, l'émission de la fluorescence peut être à nouveau observée (Fig. IV-7a).

Ici j'ai utilisé comme fluorochrome l'YFP (Yellow Fluorescent Protein) qui est séparé en deux sous-unités: YN155 (Résidus N-terminaux de la position 1 à 155) et YC155 (Résidus C-terminaux de la position 155 à 238). Ces deux parties de l'YFP sont ajoutées soit à l'extrémité C-terminale soit N-terminale des protéines à tester. Donc pour chaque couple de protéines, il y a 8 couples possibles (Fig. IV-7b).

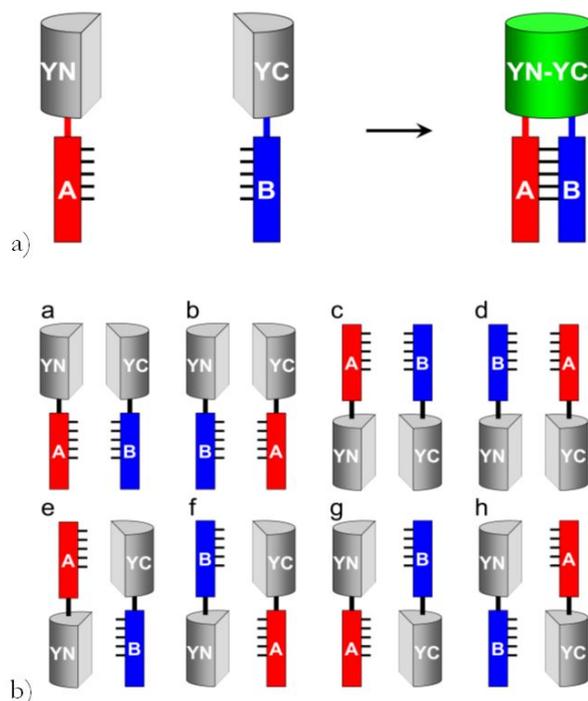


Figure IV-7 : Représentation schématique : a) du principe du BIFC et b) des différents couples possibles. (Kerppola, 2008)

Les vecteurs pBiFP1 à 4 sont utilisés comme vecteurs de destination suivant la méthode de clonage Gateway®. Ce sont des vecteurs binaires conférant aux bactéries la résistance à la spectinomycine et permettant l'expression (promoteur p35S) dans les cellules de plantes avec *A. tumefaciens*. Les gènes correspondant à Arf1c, Arf1c-GDP et Arf1c-GTP et aux SNAREs Memb11, Memb12, Sec22 mais aussi aux mutants Memb11-12 ont été clonés dans les quatre vecteurs afin de réaliser tous les couples possibles. Les constructions pour la séquence de Sec22 étaient déjà présentes dans l'équipe avant mon arrivée au laboratoire.

Vecteurs :

pBiFP1 : Séquence du gène-N-ter-YFP

pBiFP2 : N-ter-YFP-séquence du gène

pBiFP3 : C-ter-YFP-séquence du gène

pBiFP4 : Séquence du gène-C-ter-YFP

Les bactéries *A. tumefaciens* C58C1 sont transformées avec 1µl de ces différentes constructions. Puis après sélection des clones, des cotylédons d'*Arabidopsis thaliana* sont transformés (cf. section « Transformation pour l'expression transitoire ») avec les deux constructions à tester.

Les faces abaxiales des cotylédons sont ensuite observées par microscopie confocale (cf. section « Microscopie confocale »).

IV.7 Observation

IV.7.A Microscopie confocale

Toutes les observations de fluorescence ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal droit (LeicaTCSSp2, DMRXA2).

La couche inférieure de l'épiderme des cotylédons des plantes transformées a été observée avec un objectif 40 X à eau. Pour la GFP et l'YFP, l'excitation est respectivement réalisée avec le laser ion argon à 488 nm et à 514 nm. Pour la mRFP le laser He/Ne 543 est utilisé pour une excitation à 543 nm. Les fenêtres d'observation des XFP sont les suivantes, GFP : 565-620nm, YFP : 580-610 nm et mRFP : 630-680 nm. Les acquisitions pour le co-marquage YFP-mRFP ont été réalisées en mode séquentiel.

IV.7.B Microscopie électronique à transmission (MET)

IV.7.B.a Préparation des échantillons

Les études d'immunolocalisation par MET ont été réalisées sur des racines de plantules d'*A. thaliana* Col 0 ou Syp61::Syp61-CFP de 7 jours. Seul l'apex racinaire ainsi que 3-4 mm de la zone méristématique ont été cryofixés.

Le Mode opératoire de cryofixation et de cryosubstitution est présenté en annexe, ces deux méthodes utilisent respectivement l'EMPACT-1 (Leica) et l'AFS1 ou 2 (Leica).

Les racines sont ensuite coupées à l'aide d'un ultra-microtome (ReichertUltracut S) muni d'un couteau diamant. Tous d'abord le bloc de résine HM20 contenant la racine est coupé en forme de pyramide avec une lame de rasoir, puis le bloc est inséré dans l'ultra-microtome muni d'un couteau en verre afin d'enlever le surplus de résine avant d'atteindre la racine. Le couteau en verre permet de faire des coupes semi-fines de 0.50µm d'épaisseur. Puis le couteau est remplacé

par un couteau diamant histologique à eau afin d'obtenir les premières coupes semi-fines (0.1 μ m) qui seront observées au microscope photonique pour déterminer la position de la coupe dans l'échantillon. Ces coupes sont colorées au bleu de Toluidine 0.1% (p/v), séchées sur une plaque à 60°C pendant 30 secondes puis rincées à l'eau de manière à pouvoir observer l'intégrité des cellules (Fig. IV-8).

Lorsque la zone d'intérêt est atteinte, un couteau à eau de qualité supérieure est utilisé et des coupes semi-fines de 75nm sont réalisées. Ces coupes sont ensuite récupérées sur des grilles de nickel filmées avec du Parlodion (2%(p/v) dans de l'acétate d'isoamyle).

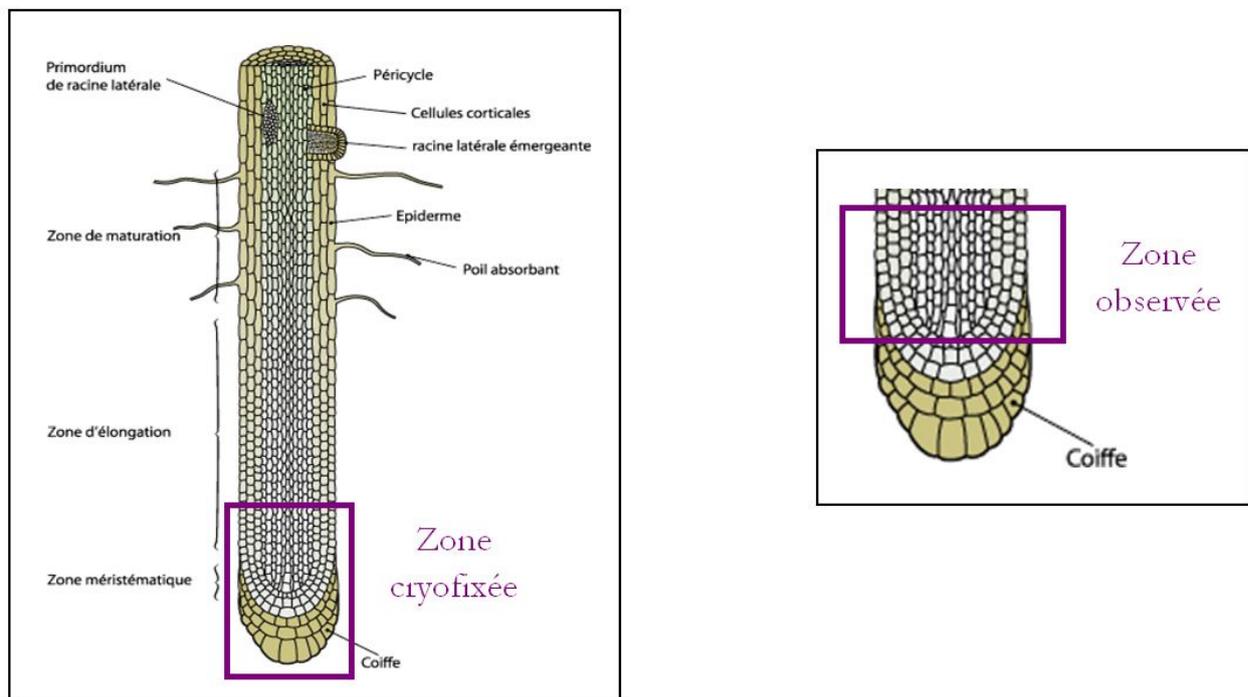


Figure IV-8 : Schémas montrant les zones des racines qui sont cryofixées et observées.

IV.7.B.b Immuno-localisation

L'immuno-marquage est réalisé suivant le mode opératoire présent en annexe 3. De nombreux contrôles sont réalisés pour tester la spécificité des anticorps en faisant toutes les étapes d'immunomarquage en omettant de mettre l'un des anticorps. Les anticorps secondaires sont couplés à des billes d'or d'un diamètre donné. Ici, l'anticorps GAR10 est utilisé, il est couplé à des billes d'or d'un diamètre de 10nm.

Nom	Anti-Memb11	GAR10
Fournisseur	LBM	Tebu-Bio
Nature	Polyclonal	Polyclonal
Origine	Lapin	Chèvre
Cible	Memb11, Memb12	IgG lapin
Dilution	1/20	1/30

Tableau 5 : liste des anticorps utilisés pour les études d'immunolocalisation observées au MET

IV.7.B.c Observation

Les observations des coupes ont été réalisées à 80kV avec un microscope électronique à transmission (MET) : Philips CM10 équipé d'une caméra digitale AMT X 60 (Elexience).

IV.8 Etude Bio-informatique

Voici la liste des logiciels utilisés :

Needle : <http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::needle>

SEAVIEW 4.4.2: <http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html>

PSIPRED: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>

PFAM : <http://pfam.sanger.ac.uk/>

TMHMM : <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

TMPred : http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html

MEMSAT 3 et -SVM : <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>

DISOPRED : <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>

I-TASSER : <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>

PROCHECK : <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/Generate.html>

QMEAN: <http://swissmodel.expasy.org/qmean/cgi/index.cgi>

UCSF Chimera : <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>

Genevestigator : <https://www.genevestigator.com/gv/plant.jsp>

BLAST : <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

GOLD : <http://www.genomesonline.org/cgi-bin/GOLD/index.cgi>

Annexe 1 : Tableaux des amorces pour les différentes PCRs

<i>Amorces pour la création des « ami RNA »</i>		
Nom	Type	Séquence
A A(CACC)	Weigel Weigel avec insertion pENTR/D- TOPO	CTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAAC CACCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAAC
B	Weigel	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG
Memb11-I Memb11-II Memb11-III Memb11-IV	miR-sens miR-antisens miR*-sens miR*-antisens	GATATTTAACAGGAATCGAGCGCTCTCTCTTTTGTATTCC GAGCGTCTGATTCCGTAAATATCAAAGAGAATCAATGA GAGCACTCGATTCCCTTAAATTTACAGGTCGTGATATG GAAATTTAAGAGGAATCGAGTGCTCTACATATATATTCCT
Memb12-I Memb12-II Memb12-III Memb12-IV	miR-sens miR-antisens miR*-sens miR*-antisens	GATCTACTATATACCTCAGGCAATCTCTCTTTTGTATTCC GATTGCCTGAGGTATATAGTAGATCAAAGAGAATCAATGA GATTACCTGAGGTATTTAGTAGTTCACAGGTCGTGATATG GAACTACTAAATACCTCAGGTAATCTACATATATATTCCT
<i>Amorces pour le clonage dans le vecteur d'entrée pDONR221</i>		
Nom		Séquence
Adaptateur attB1 Adaptateur attB2		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT
Memb11 attB1 Memb11 attB2 Memb11 sans stop attB2		GGAGATAGAACCATGGCGTCTGGTATCGTC AGAAAGCTGGGTTCAGCGTGCCATCTTAT AGAAAGCTGGGTAGCGTGTCCATCTTAT
Memb12 attB1 Memb12 attB2 Memb12 sans stop attB2		AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGCGTCTGGGACAGTG AGAAAGCTGGGTGCTAGCGTGTCCATCTTATG AGAAAGCTGGGTGCGTGTCCATCTTATGAAG
ArfA1c attB1 ArfA1c attB2 ArfA1c sans stop attB2		AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGGGTTGTCATTGGAAAAGTTGTTTCAGC AGAAAGCTGGGTCTATGCCTTGCTTGCGATGTTGTTGGAG AGAAAGCTGGGTTTGCTTGCTTGCGATGTTGTTGGAGAG
<i>Amorces pour la réalisation des mutants Memb11-Memb12 et ArfA1c</i>		
Nom		Séquence
Memb11-Δ KARD S Memb11-Δ KARD AS Memb11-ΔESSMSPD S Memb11-ΔESSMSPD AS Memb12¹⁻¹¹/Memb11 S Memb12¹⁻¹¹/Memb11 AS Memb12¹⁻²⁵/Memb11 S Memb12¹⁻²⁵/Memb11 AS Memb12¹⁻³⁸/Memb11 S Memb12¹⁻³⁸/Memb11 AS Memb12/Memb11 S Memb12/Memb11 AS		GCGAAAAGGATTCTACTCAGGGCTCGCAACGGAATCGAGAGGTTAGAG CTCTAACCTCTCGATTCCGTTGCGAGCCCTGAGTAGAATCCTTTTCGC GACTCTGATCCTACCGATCTAGCCTCCTCC GGTAGGATCAGAGTCGAACCTCTAACCTCTC GTGGGAGGGTTGTCTGAGGTATATAGTAGTGGAAAAAGG CCTTTTCGCACTACTATATACCCTCAGACAACCCTCCAC CTACTAAGAGCTCGGAATGGAATCGAGAGGTTAGAG CTCTAACCTCTCGATTCCATTCCGAGCTCTTAGTAG CGACTCTGATCCTACCGATCTAGCCTCCTCC GGAGGAGGCTAGATCGGTAGGATCAGAGTCC GATGAGGAGGCTCAAGGAATGAGCTCTGTGAAGAAC GTTCTTCACAGAGCTCATTCTTGAGCCTCCTCATC

Memb11/Memb12 S
Memb11/Memb12 AS

GATGAGGAAGCTCAAGCTATGAACTCTGTTAAG
CTTAACAGAGTTCATAGCTTGAGCTTCCTCATC

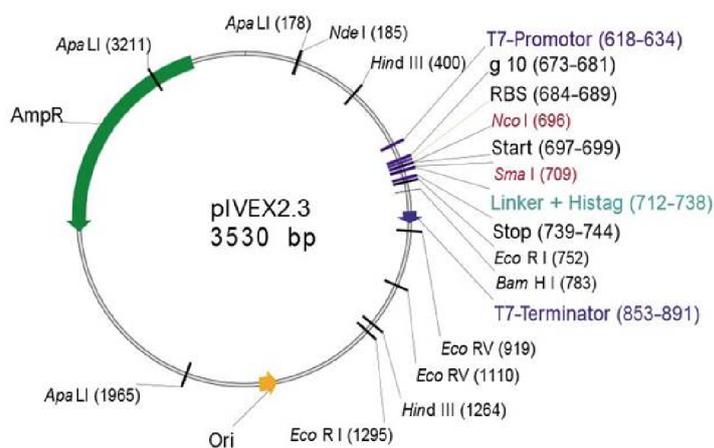
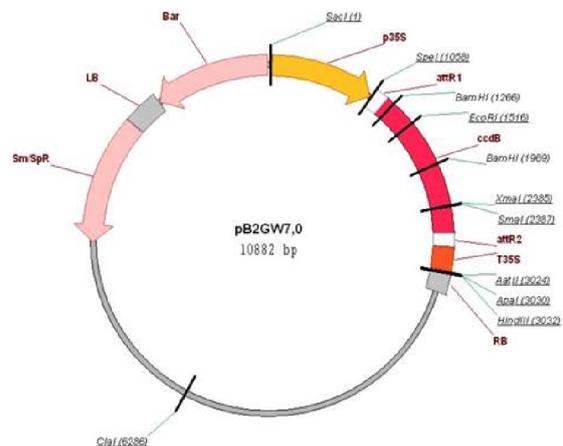
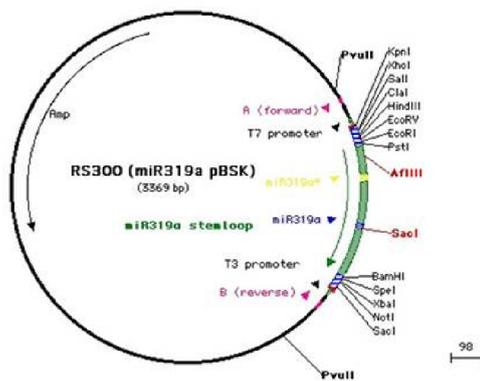
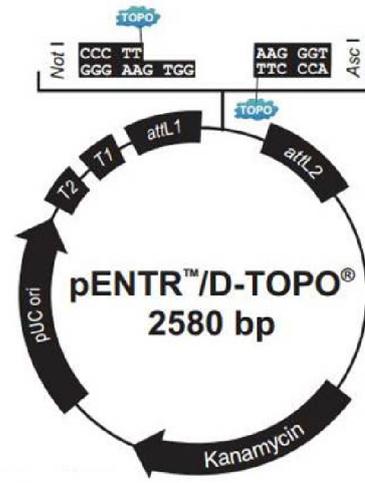
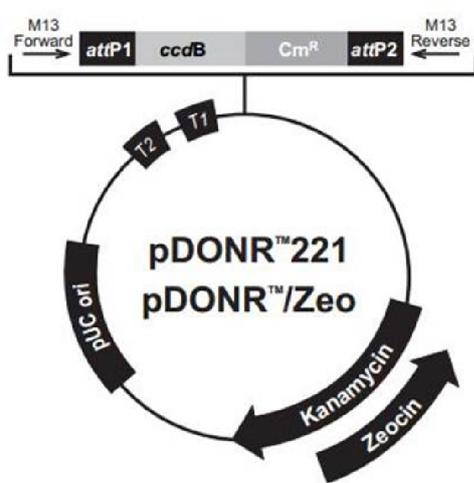
ArfA1c^{T31N} S
ArfA1c^{T31N} AS
ArfA1c^{Q71L} S
ArfA1c^{Q71L} AS

GATGCTGCTGGTAAGAACAACACTATCCTCTACAAG
CTTGTAGAGGATAGTGTCTTACCAGCAGCATC
TGGGATGTTGGGGTCTAGACAAGATCCGTCCA
TGGACGGATCTTGTCTAGACCCCAACATCCA

Amorces nécessaires au clonage des séquences nucléiques pour la synthèse de protéine *in vitro*.

Nom	Séquence
Memb11 NcoI	GACTA <u>ACCATGGCGTCTGGTATCG</u>
Memb11 SmaI	TTGAAT <u>CCCGGGACGATTGCGCC</u>
Memb12 NcoI	TGGCCAT <u>GCGTCTGGGACAGTGGGAG</u>
Memb12 SmaI	AAT <u>CCCGGGACGATTACGCCTCTCAATGAGCCTC</u>
ArfA1c NcoI	TCACCAT <u>GGGTGTTCATTTCGGAAAAGTTGTTC</u>
ArfA1c SmaI	TT <u>CCCGGGTGCCTTGCTTGC</u> GATGTTGTTGG

Annexe 2 : Schémas des différents plasmides utilisés



Annexe 3 : Protocole de préparations des échantillons pour l'immunolocalisation en microscopie électronique à transmission

IEM (ImmunoElectronMicroscopy) sur pointes racinaires d'*Arabidopsis thaliana* fixées à basse température avec de l'OsO4 (Osmium) :

Jour1 : Préparation des réactifs pour l'HPF (High Pressure Freezing) et pour la FS (Freeze Substitution)

1. Remplir bouteille d'azote
2. Nettoyer puis Coater coupelles de 200 μ m de profondeur avec PC1 % (dans chloroforme)
3. Préparer des disques d'aclar de 50 μ : découper et nettoyer dans de l'EtOH 70%
4. Préparer le cryoprotectant:

Solutions mères	Solution finale
BSA (dans frigo hybridation)	0.2g
MS	1 mL

5. Préparer de l'acétate d'uranyle 0.2% dans de l'acétone RP. Laisser toute la nuit à 4°C dans du papier Aluminium.

Solutions mères	Solution finale
AcUr boîte A	0.005g
Acétone	2,5 mL

6. Entre les programmes 3 et 5 dans l'AFS

Programme 3	Température	Time	Date et heure
Etape 1	-90°C	60h	J0-17h00
Slope1	3°C/h	13,3h	J3-05h00
Etape 2	-50°C	38h+38h+48h=98h	J3-17h20

Programme 5	Température	time
Etape1	-50°C	48h
S1	Max	max
Etape 2	20°C	48h

Jour 2 : HPF et début FS

1. Passer les pods dans l'EtOH
2. Remplir l'AFS d'azot liquide
3. Lancer le programme 3 et le mettre en pause

Préparer les coupelles

4. Déposer un fond d'héxadécène dans une coupelle coatée
5. Déposer un disque d'aclar dans la coupelle
6. Eliminer le surnageant d'héxadécène au-dessus de l'aclar
7. Mettre la coupelle sur le support de chargement
8. Remplir la coupelle de BSA en observant à la loupe
9. Déposer les racines avec un cure-dent.
10. Ajuster le niveau avec la BSA avec un papier absorbant
11. Tirer !

Après les tirs :

1. Mettre les godets métalliques de l'AFS1 dans la chambre de l'AFS
2. Préparer un petit bac avec de l'azote liquide et marquer le portoir de l'AFS1
3. Noter des eppendorfs à vise à fond plats que l'on met dans le portoir de l'AFS1
4. Préparer de l'OsO4 4% dans de l'acétone:
→ Dissoudre dans un pilulier 0.1g d'OsO4 dans 2,5mL d'acétone
5. Ajouter dans ce pilulier 2,5 mL d'acétate d'uranyle 0.2%. Mélanger.
6. Répartir le mix dans les différents tubes à vise

7. Mettre les tubes sur le portoir AFS et le plonger dans l'azote liquide
8. Une fois que le mix est congelé, disposer les tubes dans la chambre de l'AFS1 par 3 ou 4 dans les godets métalliques
9. Transférer les coupelles avec les échantillons cryofixés grâce au support de l'EMPACT dans la chambre de l'AFS
10. Disposer les coupelles à l'envers dans chaque tube
11. Remettre le Programme 3 en route: **(démarrage à 16h00)**

Programme 3	Température	Time	Date et heure
Etape 1	-90°C	60h	J0 17h00
Slope1	3°C/h	13,3h	J3 -05h00
Etape 2	-50°C	38+38h+48h=98h	J3-17h20

Les échantillons seront laissés en présence des fixateurs pendant 60h à -90°C puis 38h à -50°C avant que les lavages ne soient initiés.

Jour 6 : FS lavages

Préparer de l'acétone et de l'EtOH dans les bacs à réactifs et les placer dans l'AFS

- 1 3 Lavages à l'acétone (x15 min) avec pipette plastique effilée
- 2 Pendant les lavages préparer HM20 25% dans de l'EtOH et mettre le mélange dans l'AFS
- 3 3 lavages à l'EtOH à partir de 11h30 (3x15 min)
- 4 En parallèle des deuxièmes et 3ème lavages à l'EtOH, Démoulage avec le microtool et mettre les échantillons dans les moules plats de l'AFS2 grâce à une pipette en plastique de 3 mL
- 5 Imprégnation 2h00 avec HM20 25% dans EtOH
- 6 Pendant l'imprégnation, préparer HM20 50% et mettre le mélange à refroidir dans l'AFS
- 7 2h00 avec HM20 50%
- 8 Pendant l'imprégnation, préparer HM20 75% et mettre le mélange dans l'AFS
- 9 Laisser imprégner Overnight dans du HM20 75%
- 10 Mettre à refroidir dans l'AFS le HM20 100%

Jour 7 : inclusion en résine HM20

- 1 Nouveau bain de HM20 100% 1h00
- 2 Nouveau bain de HM20 100% 2h00
- 3 Changement de HM20, positionnement des échantillons à l'extrémité des logettes et mise du couvercle en acclar
- 4 Polymérisation : Lancer le programme 5 et mettre la lampe UV

Jour 8 : ultramicrotomie

1. Faire des coupes de 50 à 80nm
2. Pêcher les coupes par le dessous et les disposer sur des grilles Ni filmées

IEM avec l'anticorps

Du côté coupes :

- 1 Mettre les grilles sur des gouttes de 30µL d'H2O filtrée, 2x 5min
 - 2 Transférer les grilles sur 30µL de PBSTB 1x 5min, 1x15 min
 - 3 Transférer les grilles sur 20µL PBSTB avec anticorps primaire, 1x1h00 à RT
 - 4 Transférer sur 30µL de PBSTB 5x5 min
 - 5 Transférer les grilles sur 20µL PBSTB avec anticorps secondaire, 1x1h00 à RT
 - 6 Transférer sur 30µL de PBSTB 5x5 min
 - 7 Transférer sur 30µL d'H2O 5x5 min
 - 8 Transférer sur 20 µL 0.1% Gluta 1 min
 - 9 Transférer sur 30µL d'H2O 3x5 min
- (PBSTB : PBS1X, 0.2%Tween, BSA 1%)

Annexe 4 : Préparation de bactéries *E. coli* électrocompétentes

	Laboratoire de Biogénèse Membranaire	
	Mode Opératoire Préparation de bactéries <i>E.coli</i> électrocompétentes	Réf: MO-LBM-GEN-010 Version 01 Date de mise à jour: 17 Juin 2010 Page 1/1

Préparation de bactéries *E.coli* électrocompétentes

Travailler constamment en milieu stérile

La veille :

- Ensemencer une préculture de cellules en milieu LB (avec antibiotique ou non selon la souche)
- Stériliser 1 litre de glycérol 10% dans l'eau.
- Stériliser le matériel nécessaire (flacons, bouchons, erlen...)

Le jour de la préparation :

(pour 100 ml, à adapter en fonction du volume nécessaire)

- Ensemencer 100 ml de milieu LB (avec antibiotique ou non selon la souche) avec 3 ml de préculture
- Incuber à 37 °C sous agitation jusqu'à atteindre 0.6 de DO à 600 nm (environ 2 à 3 heures)
- Pré-refroidir la centrifugeuse à 4 °C

A PARTIR DE MAINTENANT : TRAVAILLER IMPERATIVEMENT DANS LA GLACE

- Répartir la culture dans des tubes ou flacons (selon le volume) stériles
- Incuber 10 min dans la glace
- Centrifuger 10 min à 4500-5000 rpm 4 °C
- Eliminer le surnageant par inversion
- Reprendre les cellules dans un volume total de 60 ml de glycérol 10%
- Centrifuger 10 min à 4500-5000 rpm 4 °C
- Eliminer le surnageant par inversion
- Reprendre les cellules dans un volume total de 20 ml de glycérol 10%
- Centrifuger 10 min à 4500-5000 rpm 4 °C
- Eliminer le surnageant par inversion
- Reprendre les cellules dans un volume total de 10 ml de glycérol 10%
- Centrifuger 10 min à 4500-5000 rpm 4 °C
- Eliminer le surnageant par inversion
- Reprendre les cellules dans un volume total de 400 µl de glycérol 10%
- Aliquoter par 50 µl en tubes Eppendorf stériles refroidis dans la glace ou l'azote.
- Placer les aliquots le plus rapidement possible dans l'azote
- Congeler à - 80 °C

V BIBLIOGRAPHIE

Allan, B.B., Moyer, B.D., and Balch, W.E. (2000). Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion. *Science* 289, 444–448.

Altan-Bonnet, N., Sougrat, R., and Lippincott-Schwartz, J. (2004). Molecular basis for Golgi maintenance and biogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 364–372.

Anders, N., and Jürgens, G. (2008). Large ARF guanine nucleotide exchange factors in membrane trafficking. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3433–3445.

Antonny, B., Beraud-Dufour, S., Chardin, P., and Chabre, M. (1997a). N-Terminal Hydrophobic Residues of the G-Protein ADP-Ribosylation Factor-1 Insert into Membrane Phospholipids upon GDP to GTP Exchange†. *Biochemistry (Mosc.)* 36, 4675–4684.

Antonny, B., Huber, I., Paris, S., Chabre, M., and Cassel, D. (1997b). Activation of ADP-ribosylation Factor 1 GTPase-Activating Protein by Phosphatidylcholine-derived Diacylglycerols. *J. Biol. Chem.* 272, 30848–30851.

Antonny, B., Madden, D., Hamamoto, S., Orci, L., and Schekman, R. (2001). Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nat. Cell Biol.* 3, 531–537.

Aoki, T., Ichimura, S., Itoh, A., Kuramoto, M., Shinkawa, T., Isobe, T., and Tagaya, M. (2009). Identification of the Neuroblastoma-amplified Gene Product as a Component of the Syntaxin 18 Complex Implicated in Golgi-to-Endoplasmic Reticulum Retrograde Transport. *Mol. Biol. Cell* 20, 2639–2649.

Avisar, D., Prokhnevsky, A.I., Makarova, K.S., Koonin, E.V., and Dolja, V.V. (2008). Myosin XI-K Is Required for Rapid Trafficking of Golgi Stacks, Peroxisomes, and Mitochondria in Leaf Cells of *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol.* 146, 1098–1108.

Barlowe, C., and Schekman, R. (1993). SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature* 365, 347–349.

Barlowe, C.K., and Miller, E.A. (2013). Secretory Protein Biogenesis and Traffic in the Early Secretory Pathway. *Genetics* 193, 383–410.

Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M.F., Ravazzola, M., Amherdt, M., and Schekman, R. (1994). COPII: A membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* 77, 895–907.

Bassham, D.C., Brandizzi, F., Otegui, M.S., and Sanderfoot, A.A. (2008). The Secretory System of Arabidopsis. *Arab. Book Am. Soc. Plant Biol.* 6.

Bharucha, N., Liu, Y., Papanikou, E., McMahan, C., Esaki, M., Jeffrey, P.D., Hughson, F.M., and Glick, B.S. (2013). Sec16 influences transitional ER sites by regulating rather than organizing COPII. *Mol. Biol. Cell.*

- Bi, X., Corpina, R.A., and Goldberg, J. (2002). Structure of the Sec23/24–Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature* *419*, 271–277.
- Bi, X., Mancias, J.D., and Goldberg, J. (2007). Insights into COPII Coat Nucleation from the Structure of Sec23•Sar1 Complexed with the Active Fragment of Sec31. *Dev. Cell* *13*, 635–645.
- Bielli, A., Haney, C.J., Gabreski, G., Watkins, S.C., Bannykh, S.I., and Aridor, M. (2005). Regulation of Sar1 NH2 terminus by GTP binding and hydrolysis promotes membrane deformation to control COPII vesicle fission. *J. Cell Biol.* *171*, 919–924.
- Bigay, J., Gounon, P., Robineau, S., and Antonny, B. (2003). Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature. *Nature* *426*, 563–566.
- Bigay, J., Casella, J.-F., Drin, G., Mesmin, B., and Antonny, B. (2005). ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *EMBO J.* *24*, 2244–2253.
- Bock, J.B., Matern, H.T., Peden, A.A., and Scheller, R.H. (2001). A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* *409*, 839–841.
- Boevink, P., Oparka, K., Cruz, S.S., Martin, B., Betteridge, A., and Hawes, C. (1998). Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network†. *Plant J.* *15*, 441–447.
- Brandizzi, F., and Barlowe, C. (2013). Organization of the ER–Golgi interface for membrane traffic control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 382–392.
- Bubeck, J., Scheuring, D., Hummel, E., Langhans, M., Viotti, C., Foresti, O., Denecke, J., Banfield, D.K., and Robinson, D.G. (2008). The Syntaxins SYP31 and SYP81 Control ER–Golgi Trafficking in the Plant Secretory Pathway. *Traffic* *9*, 1629–1652.
- Buchan, D.W.A., Ward, S.M., Lobley, A.E., Nugent, T.C.O., Bryson, K., and Jones, D.T. (2010). Protein annotation and modelling servers at University College London. *Nucleic Acids Res.* *38*, W563–W568.
- Burri, L., and Lithgow, T. (2004). A Complete Set of SNAREs in Yeast. *Traffic* *5*, 45–52.
- Cai, H., Yu, S., Menon, S., Cai, Y., Lazarova, D., Fu, C., Reinisch, K., Hay, J.C., and Ferro-Novick, S. (2007). TRAPPI tethers COPII vesicles by binding the coat subunit Sec23. *Nature* *445*, 941–944.
- Cao, X., Ballew, N., and Barlowe, C. (1998). Initial docking of ER-derived vesicles requires Uso1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins. *EMBO J.* *17*, 2156–2165.
- Chatre, L., Brandizzi, F., Hocquellet, A., Hawes, C., and Moreau, P. (2005). Sec22 and Memb11 Are v-SNAREs of the Anterograde Endoplasmic Reticulum–Golgi Pathway in Tobacco Leaf Epidermal Cells. *Plant Physiol.* *139*, 1244–1254.

- Cheever, M.L., Sato, T.K., de Beer, T., Kutateladze, T.G., Emr, S.D., and Overduin, M. (2001). Phox domain interaction with PtdIns(3)P targets the Vam7 t-SNARE to vacuole membranes. *Nat. Cell Biol.* *3*, 613–618.
- Claude, A., Zhao, B.-P., Kuziemsy, C.E., Dahan, S., Berger, S.J., Yan, J.-P., Arnold, A.D., Sullivan, E.M., and Melançon, P. (1999). Gbf1 A Novel Golgi-Associated Bfa-Resistant Guanine Nucleotide Exchange Factor That Displays Specificity for Adp-Ribosylation Factor 5. *J. Cell Biol.* *146*, 71–84.
- Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* *16*, 735–743.
- Colbert, K.N., Hattendorf, D.A., Weiss, T.M., Burkhardt, P., Fasshauer, D., and Weis, W.I. (2013). Syntaxin1a variants lacking an N-peptide or bearing the LE mutation bind to Munc18a in a closed conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 12637–12642.
- Cosson, P., Lefkir, Y., Démollière, C., and Letourneur, F. (1998). New COP1-binding motifs involved in ER retrieval. *EMBO J.* *17*, 6863–6870.
- D'Souza-Schorey, C., and Chavrier, P. (2006). ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 347–358.
- Dancourt, J., and Barlowe, C. (2010). Protein Sorting Receptors in the Early Secretory Pathway. *Annu. Rev. Biochem.* *79*, 777–802.
- daSilva, L.L.P., Snapp, E.L., Denecke, J., Lippincott-Schwartz, J., Hawes, C., and Brandizzi, F. (2004). Endoplasmic Reticulum Export Sites and Golgi Bodies Behave as Single Mobile Secretory Units in Plant Cells. *Plant Cell Online* *16*, 1753–1771.
- Dettmer, J., Hong-Hermesdorf, A., Stierhof, Y.-D., and Schumacher, K. (2006). Vacuolar H⁺-ATPase Activity Is Required for Endocytic and Secretory Trafficking in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *18*, 715–730.
- Dogic, D., de Chassey, B., Pick, E., Cassel, D., Lefkir, Y., Hennecke, S., Cosson, P., and Letourneur, F. (1999). The ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein Glo3p is involved in ER retrieval. *Eur. J. Cell Biol.* *78*, 305–310.
- Donohoe, B.S., Kang, B.-H., and Staehelin, L.A. (2007). Identification and characterization of COPIa- and COPIb-type vesicle classes associated with plant and algal Golgi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 163–168.
- Drakakaki, G., and Dandekar, A. (2013). Protein secretion: How many secretory routes does a plant cell have? *Plant Sci.* *203–204*, 74–78.
- Dulubova, I., Sugita, S., Hill, S., Hosaka, M., Fernandez, I., Südhof, T.C., and Rizo, J. (1999). A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *EMBO J.* *18*, 4372–4382.
- Farquhar, M.G., and Palade, G.E. (1998). The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends Cell Biol.* *8*, 2–10.

- Fasshauer, D., Sutton, R.B., Brunger, A.T., and Jahn, R. (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 15781–15786.
- Fath, S., Mancias, J.D., Bi, X., and Goldberg, J. (2007). Structure and Organization of Coat Proteins in the COPII Cage. *Cell* *129*, 1325–1336.
- Flamenbaum, G., Abillon, E., and Benzécéri, J.P. (1979). Typologie et analyse factorielle d'un ensemble de conformations moléculaires : application à l'Angiotensine II. *Cah. Anal. Données* 339–355.
- Geldner, N., Dénervaud-Tendon, V., Hyman, D.L., Mayer, U., Stierhof, Y.-D., and Chory, J. (2009). Rapid, combinatorial analysis of membrane compartments in intact plants with a multicolor marker set. *Plant J.* *59*, 169–178.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W.-K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K., and Weissman, J.S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* *425*, 737–741.
- Goldberg, J. (2000). Decoding of Sorting Signals by Coatomer through a GTPase Switch in the COPI Coat Complex. *Cell* *100*, 671–679.
- Gommel, D.U., Memon, A.R., Heiss, A., Lottspeich, F., Pfannstiel, J., Lechner, J., Reinhard, C., Helms, J.B., Nickel, W., and Wieland, F.T. (2001). Recruitment to Golgi membranes of ADP-ribosylation factor 1 is mediated by the cytoplasmic domain of p23. *EMBO J.* *20*, 6751–6760.
- Guerriero, G., Fugelstad, J., and Bulone, V. (2010). What Do We Really Know about Cellulose Biosynthesis in Higher Plants? *J. Integr. Plant Biol.* *52*, 161–175.
- Hanson, P.I., Heuser, J.E., and Jahn, R. (1997a). Neurotransmitter release — four years of SNARE complexes. *Curr. Opin. Neurobiol.* *7*, 310–315.
- Hanson, P.I., Roth, R., Morisaki, H., Jahn, R., and Heuser, J.E. (1997b). Structure and Conformational Changes in NSF and Its Membrane Receptor Complexes Visualized by Quick-Freeze/Deep-Etch Electron Microscopy. *Cell* *90*, 523–535.
- Hanton, S.L., Chatre, L., Renna, L., Matheson, L.A., and Brandizzi, F. (2007). De Novo Formation of Plant Endoplasmic Reticulum Export Sites Is Membrane Cargo Induced and Signal Mediated. *Plant Physiol.* *143*, 1640–1650.
- Harrison, S.C., and Kirchhausen, T. (2010). Structural biology: Conservation in vesicle coats. *Nature* *466*, 1048–1049.
- Hayashi, T., McMahon, H., Yamasaki, S., Binz, T., Hata, Y., Südhof, T.C., and Niemann, H. (1994). Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO J.* *13*, 5051.

- Hoffman, G.R., Rahl, P.B., Collins, R.N., and Cerione, R.A. (2003). Conserved Structural Motifs in Intracellular Trafficking Pathways: Structure of the γ COP Appendage Domain. *Mol. Cell* 12, 615–625.
- Hohl, T.M., Parlati, F., Wimmer, C., Rothman, J.E., Söllner, T.H., and Engelhardt, H. (1998). Arrangement of Subunits in 20 S Particles Consisting of NSF, SNAPs, and SNARE Complexes. *Mol. Cell* 2, 539–548.
- Honda, A., Al-Awar, O.S., Hay, J.C., and Donaldson, J.G. (2005). Targeting of Arf-1 to the early Golgi by membrin, an ER-Golgi SNARE. *J. Cell Biol.* 168, 1039–1051.
- Hsia, K.-C., and Hoelz, A. (2010). Crystal structure of α -COP in complex with ϵ -COP provides insight into the architecture of the COPI vesicular coat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 11271–11276.
- Hu, C., Ahmed, M., Melia, T.J., Söllner, T.H., Mayer, T., and Rothman, J.E. (2003). Fusion of Cells by Flipped SNAREs. *Science* 300, 1745–1749.
- Hua, S.-Y., and Charlton, M.P. (1999). Activity-dependent changes in partial VAMP complexes during neurotransmitter release. *Nat. Neurosci.* 2, 1078–1083.
- Huang, M., Weissman, J.T., Béraud-Dufour, S., Luan, P., Wang, C., Chen, W., Aridor, M., Wilson, I.A., and Balch, W.E. (2001). Crystal structure of Sar1-GDP at 1.7 Å resolution and the role of the NH2 terminus in ER export. *J. Cell Biol.* 155, 937–948.
- Hughes, H., Budnik, A., Schmidt, K., Palmer, K.J., Mantell, J., Noakes, C., Johnson, A., Carter, D.A., Verkade, P., Watson, P., et al. (2009). Organisation of human ER-exit sites: requirements for the localisation of Sec16 to transitional ER. *J. Cell Sci.* 122, 2924–2934.
- Jahn, R., and Scheller, R.H. (2006). SNAREs — engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 631–643.
- Jürgens, G., and Geldner, N. (2002). Protein Secretion in Plants: from the trans-Golgi Network to the Outer Space. *Traffic* 3, 605–613.
- Kang, B.-H., and Staehelin, L.A. (2008). ER-to-Golgi transport by COPII vesicles in Arabidopsis involves a ribosome-excluding scaffold that is transferred with the vesicles to the Golgi matrix - Springer. *Protoplasma* 51–64.
- Kawamoto, K., Yoshida, Y., Tamaki, H., Torii, S., Shinotsuka, C., Yamashina, S., and Nakayama, K. (2002). GBF1, a Guanine Nucleotide Exchange Factor for ADP-Ribosylation Factors, is Localized to the cis-Golgi and Involved in Membrane Association of the COPI Coat. *Traffic* 3, 483–495.
- Keegstra, K., and Raikhel, N. (2001). Plant glycosyltransferases. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 219–224.
- Kerppola, T.K. (2008). Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analysis as a Probe of Protein Interactions in Living Cells. *Annu. Rev. Biophys.* 37, 465–487.

- Kondoh, K., Torii, S., and Nishida, E. (2005). Control of MAP kinase signaling to the nucleus. *Chromosoma* *114*, 86–91.
- Kung, L.F., Pagant, S., Futai, E., D’Arcangelo, J.G., Buchanan, R., Dittmar, J.C., Reid, R.J.D., Rothstein, R., Hamamoto, S., Snapp, E.L., et al. (2012). Sec24p and Sec16p cooperate to regulate the GTP cycle of the COPII coat. *EMBO J.* *31*, 1014–1027.
- Langhans, M., Marcote, M.J., Pimpl, P., Virgili-López, G., Robinson, D.G., and Aniento, F. (2008). In vivo Trafficking and Localization of p24 Proteins in Plant Cells. *Traffic* *9*, 770–785.
- Langhans, M., Meckel, T., Kress, A., Lerich, A., and Robinson, D.G. (2012). ERES (ER exit sites) and the “Secretory Unit Concept.” *J. Microsc.* *247*, 48–59.
- Lee, C., and Goldberg, J. (2010). Structure of Coatamer Cage Proteins and the Relationship among COPI, COPII, and Clathrin Vesicle Coats. *Cell* *142*, 123–132.
- Lee, M.C.S., Orci, L., Hamamoto, S., Futai, E., Ravazzola, M., and Schekman, R. (2005). Sar1p N-Terminal Helix Initiates Membrane Curvature and Completes the Fission of a COPII Vesicle. *Cell* *122*, 605–617.
- Lee, M.H., Min, M.K., Lee, Y.J., Jin, J.B., Shin, D.H., Kim, D.H., Lee, K.-H., and Hwang, I. (2002). ADP-Ribosylation Factor 1 of Arabidopsis Plays a Critical Role in Intracellular Trafficking and Maintenance of Endoplasmic Reticulum Morphology in Arabidopsis. *Plant Physiol.* *129*, 1507–1520.
- Lerich, A., Hillmer, S., Langhans, M., Scheuring, D., van Bentum, P., and Robinson, D.G. (2012). ER Import Sites and Their Relationship to ER Exit Sites: A New Model for Bidirectional ER-Golgi Transport in Higher Plants. *Front. Plant Sci.* *3*.
- Letourneur, F., Gaynor, E.C., Hennecke, S., Démollière, C., Duden, R., Emr, S.D., Riezman, H., and Cosson, P. (1994). Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* *79*, 1199–1207.
- Li, L., Shimada, T., Takahashi, H., Koumoto, Y., Shirakawa, M., Takagi, J., Zhao, X., Tu, B., Jin, H., Shen, Z., et al. (2013). MAG2 and three MAG2 INTERACTING PROTEINS form an ER-localized complex to facilitate the storage protein transport in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* n/a–n/a.
- Lipka, V., Kwon, C., and Panstruga, R. (2007). SNARE-Ware: The Role of SNARE-Domain Proteins in Plant Biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *23*, 147–174.
- Lord, C., Bhandari, D., Menon, S., Ghassemian, M., Nycz, D., Hay, J., Ghosh, P., and Ferro-Novick, S. (2011). Sequential interactions with Sec23 control the direction of vesicle traffic. *Nature* *473*, 181–186.
- Lorente-Rodriguez, A., and Barlowe, C. (2011). Entry and Exit Mechanisms at the cis-Face of the Golgi Complex. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*, a005207–a005207.

- Luo, R., and Randazzo, P.A. (2008). Kinetic Analysis of Arf GAP1 Indicates a Regulatory Role for Coatamer. *J. Biol. Chem.* *283*, 21965–21977.
- Malsam, J., Kreye, S., and Söllner, T.H. (2008). Membrane fusion: SNAREs and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* *65*, 2814–2832.
- Mancias, J.D., and Goldberg, J. (2008). Structural basis of cargo membrane protein discrimination by the human COPII coat machinery. *EMBO J.* *27*, 2918–2928.
- Marchler-Bauer, A., Zheng, C., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Lanczycki, C.J., et al. (2013). CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. *Nucleic Acids Res.* *41*, D348–352.
- Marti, L., Fornaciari, S., Renna, L., Stefano, G., and Brandizzi, F. (2010). COPII-mediated traffic in plants. *Trends Plant Sci.* *15*, 522–528.
- Matheson, L.A., Suri, S.S., Hanton, S.L., Chatre, L., and Brandizzi, F. (2008). Correct Targeting of Plant ARF GTPases Relies on Distinct Protein Domains. *Traffic* *9*, 103–120.
- Matsuoka, K., Orci, L., Amherdt, M., Bednarek, S.Y., Hamamoto, S., Schekman, R., and Yeung, T. (1998). COPII-Coated Vesicle Formation Reconstituted with Purified Coat Proteins and Chemically Defined Liposomes. *Cell* *93*, 263–275.
- Matteis, M.A.D., and Morrow, J.S. (2000). Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway. *J. Cell Sci.* *113*, 2331–2343.
- Mayer, A., Wickner, W., and Haas, A. (1996). Sec18p (NSF)-Driven Release of Sec17p (α -SNAP) Can Precede Docking and Fusion of Yeast Vacuoles. *Cell* *85*, 83–94.
- Meel, E., and Klumperman, J. (2008). Imaging and imagination: understanding the endo-lysosomal system. *Histochem. Cell Biol.* *129*, 253–266.
- Melia, T.J., Weber, T., McNew, J.A., Fisher, L.E., Johnston, R.J., Parlati, F., Mahal, L.K., Söllner, T.H., and Rothman, J.E. (2002). Regulation of membrane fusion by the membrane-proximal coil of the t-SNARE during zippering of SNAREpins. *J. Cell Biol.* *158*, 929–940.
- Min, M.K., Jang, M., Lee, M., Lee, J., Song, K., Lee, Y., Hur, M.-W., Robinson, D.G., and Hwang, I. (2012). Recruitment of Arf1-GDP to Golgi by Glo3p-type ArfGAPs is crucial for Golgi maintenance and plant growth. *Plant Physiol.*
- Montegna, E.A., Bhave, M., Liu, Y., Bhattacharyya, D., and Glick, B.S. (2012). Sec12 Binds to Sec16 at Transitional ER Sites. *PLoS ONE* *7*, e31156.
- Montesinos, J.C., Sturm, S., Langhans, M., Hillmer, S., Marcote, M.J., Robinson, D.G., and Aniento, F. (2012). Coupled transport of Arabidopsis p24 proteins at the ER–Golgi interface. *J. Exp. Bot.* *63*, 4243–4261.
- Montesinos, J.C., Langhans, M., Sturm, S., Hillmer, S., Aniento, F., Robinson, D.G., and Marcote, M.J. (2013). Putative p24 complexes in Arabidopsis contain members of the

delta and beta subfamilies and cycle in the early secretory pathway. *J. Exp. Bot.* *64*, 3147–3167.

Nebenführ, A., Gallagher, L.A., Dunahay, T.G., Frohlick, J.A., Mazurkiewicz, A.M., Meehl, J.B., and Staehelin, L.A. (1999). Stop-and-Go Movements of Plant Golgi Stacks Are Mediated by the Acto-Myosin System. *Plant Physiol.* *121*, 1127–1141.

Orci, L., Ravazzola, M., Volchuk, A., Engel, T., Gmachl, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Sollner, T.H., and Rothman, J.E. (2000). Anterograde flow of cargo across the Golgi stack potentially mediated via bidirectional “percolating” COPI vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 10400–10405.

Park, M., Touihri, S., Müller, I., Mayer, U., and Jürgens, G. (2012). Sec1/Munc18 Protein Stabilizes Fusion-Competent Syntaxin for Membrane Fusion in Arabidopsis Cytokinesis. *Dev. Cell* *22*, 989–1000.

Parlati, F., Varlamov, O., Paz, K., McNew, J.A., Hurtado, D., Söllner, T.H., and Rothman, J.E. (2002). Distinct SNARE complexes mediating membrane fusion in Golgi transport based on combinatorial specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 5424–5429.

Peremyslov, V.V., Prokhnevsky, A.I., Avisar, D., and Dolja, V.V. (2008). Two Class XI Myosins Function in Organelle Trafficking and Root Hair Development in Arabidopsis. *Plant Physiol.* *146*, 1109–1116.

Pertsinidis, A., Mukherjee, K., Sharma, M., Pang, Z.P., Park, S.R., Zhang, Y., Brunger, A.T., Südhof, T.C., and Chu, S. (2013). Ultrahigh-resolution imaging reveals formation of neuronal SNARE/Munc18 complexes in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, E2812–E2820.

Phi Poon, P., Cassel, D., Spang, A., Rotman, M., Pick, E., Singer, R.A., and Johnston, G.C. (1999). Retrograde transport from the yeast Golgi is mediated by two ARF GAP proteins with overlapping function. *EMBO J.* *18*, 555–564.

Pobbati, A.V., Stein, A., and Fasshauer, D. (2006). N- to C-Terminal SNARE Complex Assembly Promotes Rapid Membrane Fusion. *Science* *313*, 673–676.

Presley, J.F., Cole, N.B., Schroer, T.A., Hirschberg, K., Zaal, K.J.M., and Lippincott-Schwartz, J. (1997). ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* *389*, 81–85.

Prouzet-Mauléon, V., Lefebvre, F., Thoraval, D., Crouzet, M., and Doignon, F. (2008). Phosphoinositides Affect both the Cellular Distribution and Activity of the F-BAR-containing RhoGAP Rgd1p in Yeast. *J. Biol. Chem.* *283*, 33249–33257.

Ren, Y., Yip, C.K., Tripathi, A., Huie, D., Jeffrey, P.D., Walz, T., and Hughson, F.M. (2009). A Structure-Based Mechanism for Vesicle Capture by the Multisubunit Tethering Complex Dsl1. *Cell* *139*, 1119–1129.

Robert, S., Chary, S.N., Drakakaki, G., Li, S., Yang, Z., Raikhel, N.V., and Hicks, G.R. (2008). Endosidin1 defines a compartment involved in endocytosis of the brassinosteroid receptor BRI1 and the auxin transporters PIN2 and AUX1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 8464–8469.

- Robinson, M.S. (2004). Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends Cell Biol.* *14*, 167–174.
- Robinson, D.G., Herranz, M.-C., Bubeck, J., Pepperkok, R., and Ritzenthaler, C. (2007). Membrane Dynamics in the Early Secretory Pathway. *Crit. Rev. Plant Sci.* *26*, 199–225.
- Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* *5*, 725–738.
- Sabatini, D.D., Blobel, G., Nonomura, Y., and Adelman, M.R. (1971). Ribosome-membrane interaction: Structural aspects and functional implications. *Adv. Cytopharmacol.* *1*, 119–129.
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *J. Theor. Biol.* *14*, 225–IN6.
- Saito, C., and Ueda, T. (2009). Chapter 4 Functions of RAB and SNARE Proteins in Plant Life. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, Kwang W. Jeon, ed. (Academic Press), pp. 183–233.
- Saito, K., Yamashiro, K., Ichikawa, Y., Erlmann, P., Kontani, K., Malhotra, V., and Katada, T. (2011). cTAGE5 mediates collagen secretion through interaction with TANGO1 at endoplasmic reticulum exit sites. *Mol. Biol. Cell* *22*, 2301–2308.
- Sanderfoot, A. (2007). Increases in the Number of SNARE Genes Parallels the Rise of Multicellularity among the Green Plants. *PLANT Physiol.* *144*, 6–17.
- Sanderfoot, A.A., and Raikhel, N.V. (2003). The Secretory System of Arabidopsis. *Arab. Book Am. Soc. Plant Biol.*
- Di Sansebastiano, G.-P. (2013). Defining new SNARE functions: the i-SNARE. *Front. Plant Sci.* *4*.
- Sato, K., Sato, M., and Nakano, A. (2001). Rer1p, a retrieval receptor for endoplasmic reticulum membrane proteins, is dynamically localized to the Golgi apparatus by coatmer. *J. Cell Biol.* *152*, 935–944.
- Sato, K., Sato, M., and Nakano, A. (2003). Rer1p, a Retrieval Receptor for ER Membrane Proteins, Recognizes Transmembrane Domains in Multiple Modes. *Mol. Biol. Cell* *14*, 3605–3616.
- Sato, M., Sato, K., and Nakano, A. (1996). Endoplasmic reticulum localization of Sec12p is achieved by two mechanisms: Rer1p-dependent retrieval that requires the transmembrane domain and Rer1p-independent retention that involves the cytoplasmic domain. *J. Cell Biol.* *134*, 279–293.
- Semenza, J.C., Hardwick, K.G., Dean, N., and Pelham, H.R.B. (1990). ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell* *61*, 1349–1357.

Shikano, S., and Li, M. (2003). Membrane receptor trafficking: Evidence of proximal and distal zones conferred by two independent endoplasmic reticulum localization signals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 5783–5788.

Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., and Rothman, J.E. (1993a). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* *362*, 318–324.

Söllner, T., Bennett, M.K., Whiteheart, S.W., Scheller, R.H., and Rothman, J.E. (1993b). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* *75*, 409–418.

Spang, A. (2012). The DSL1 Complex: The Smallest but Not the Least CATCHR. *Traffic* *13*, 908–913.

Spang, A., and Schekman, R. (1998). Reconstitution of Retrograde Transport from the Golgi to the ER In Vitro. *J. Cell Biol.* *143*, 589–599.

Sparkes, I.A., Teanby, N.A., and Hawes, C. (2008). Truncated myosin XI tail fusions inhibit peroxisome, Golgi, and mitochondrial movement in tobacco leaf epidermal cells: a genetic tool for the next generation. *J. Exp. Bot.* *59*, 2499–2512.

Springer, S., Spang, A., and Schekman, R. (1999). A Primer on Vesicle Budding. *Cell* *97*, 145–148.

Stefano, G., Renna, L., Hanton, S.L., Moreau, P., Hawes, C., Brandizzi, F., and Chatre, L. (2006). In tobacco leaf epidermal cells, the integrity of protein export from the endoplasmic reticulum and of ER export sites depends on active COPI machinery. *Plant J.* *46*, 95–110.

Stefanovic, S., and Hegde, R.S. (2007). Identification of a Targeting Factor for Posttranslational Membrane Protein Insertion into the ER. *Cell* *128*, 1147–1159.

Strop, P., Kaiser, S.E., Vrljic, M., and Brunger, A.T. (2008). The Structure of the Yeast Plasma Membrane SNARE Complex Reveals Destabilizing Water-filled Cavities. *J. Biol. Chem.* *283*, 1113–1119.

Südhof, T.C., and Rothman, J.E. (2009). Membrane Fusion: Grappling with SNARE and SM Proteins. *Science* *323*, 474–477.

Sutter, J.-U., Campanoni, P., Blatt, M.R., and Paneque, M. (2006). Setting SNAREs in a Different Wood. *Traffic* *7*, 627–638.

Szul, T., and Sztul, E. (2011). COPII and COPI Traffic at the ER-Golgi Interface. *Physiology* *26*, 348–364.

Tompa, P., and Fuxreiter, M. (2008). Fuzzy complexes: polymorphism and structural disorder in protein-protein interactions. *Trends Biochem. Sci.* *33*, 2–8.

- Tripathi, A., Ren, Y., Jeffrey, P.D., and Hughson, F.M. (2009). Structural characterization of Tip20p and Dsl1p, subunits of the Dsl1p vesicle tethering complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 114–123.
- Tsui, M.M.K., Tai, W.C.S., and Banfield, D.K. (2001). Selective Formation of Sed5p-containing SNARE Complexes Is Mediated by Combinatorial Binding Interactions. *Mol. Biol. Cell* *12*, 521–538.
- Uemura, T., Ueda, T., Ohniwa, R.L., Nakano, A., Takeyasu, K., and Sato, M.H. (2004). Systematic Analysis of SNARE Molecules in Arabidopsis: Dissection of the post-Golgi Network in Plant Cells. *Cell Struct. Funct.* *29*, 49–65.
- Vernoud, V., Horton, A.C., Yang, Z., and Nielsen, E. (2003). Analysis of the Small GTPase Gene Superfamily of Arabidopsis. *Plant Physiol.* *131*, 1191–1208.
- Viotti, C., Bubeck, J., Stierhof, Y.-D., Krebs, M., Langhans, M., Berg, W. van den, Dongen, W. van, Richter, S., Geldner, N., Takano, J., et al. (2010). Endocytic and Secretory Traffic in Arabidopsis Merge in the Trans-Golgi Network/Early Endosome, an Independent and Highly Dynamic Organelle. *Plant Cell Online* *22*, 1344–1357.
- Watson, P.J., Frigerio, G., Collins, B.M., Duden, R., and Owen, D.J. (2004). γ -COP Appendage Domain – Structure and Function. *Traffic* *5*, 79–88.
- Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Söllner, T.H., and Rothman, J.E. (1998). SNAREpins: Minimal Machinery for Membrane Fusion. *Cell* *92*, 759–772.
- Whittle, J.R.R., and Schwartz, T.U. (2010). Structure of the Sec13–Sec16 edge element, a template for assembly of the COPII vesicle coat. *J. Cell Biol.* *190*, 347–361.
- Yamakawa, H., Seog, D.-H., Yoda, K., Yamasaki, M., and Wakabayashi, T. (1996). Uso1 Protein Is a Dimer with Two Globular Heads and a Long Coiled-Coil Tail. *J. Struct. Biol.* *116*, 356–365.
- Yorimitsu, T., and Sato, K. (2012). Insights into structural and regulatory roles of Sec16 in COPII vesicle formation at ER exit sites. *Mol. Biol. Cell* *23*, 2930–2942.
- Yu, H., Rathore, S.S., Lopez, J.A., Davis, E.M., James, D.E., Martin, J.L., and Shen, J. (2013). Comparative studies of Munc18c and Munc18-1 reveal conserved and divergent mechanisms of Sec1/Munc18 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, E3271–E3280.
- Yu, W., Lin, J., Jin, C., and Xia, B. (2009). Solution Structure of Human ζ -COP: Direct Evidences for Structural Similarity between COP I and Clathrin-Adaptor Coats. *J. Mol. Biol.* *386*, 903–912.
- Zhang, C., Cavenagh, M.M., and Kahn, R.A. (1998). A Family of Arf Effectors Defined as Suppressors of the Loss of Arf Function in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *273*, 19792–19796.

Zhang, C.-J., Bowzard, J.B., Anido, A., and Kahn, R.A. (2003). Four ARF GAPs in *Saccharomyces cerevisiae* have both overlapping and distinct functions. *Yeast* *20*, 315–330.

Zhang, X., Zhao, H., Gao, S., Wang, W.-C., Katiyar-Agarwal, S., Huang, H.-D., Raikhel, N., and Jin, H. (2011). *Arabidopsis* Argonaute 2 regulates innate immunity via miRNA393*-mediated silencing of a Golgi-localized SNARE gene MEMB12. *Mol. Cell* *42*, 356–366.

Zheng, P., Gao, F., Deng, K., Gong, W., and Sun, Z. (2013). Expression, purification and preliminary X-ray crystallographic analysis of Arf1-GDP in complex with dimeric p23 peptide. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* *69*, 1155–1158.

Zink, S., Wenzel, D., Wurm, C.A., and Schmitt, H.D. (2009). A Link between ER Tethering and COP-I Vesicle Uncoating. *Dev. Cell* *17*, 403–416.