



HAL
open science

Septines : fonctions et organisation structurale

Mamadou Faty

► **To cite this version:**

Mamadou Faty. Septines : fonctions et organisation structurale. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT : 2019STRAJ107 . tel-02920063

HAL Id: tel-02920063

<https://theses.hal.science/tel-02920063>

Submitted on 24 Aug 2020

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

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

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
Science de la vie et de la santé

THÈSE présentée par :
[Mamadou FATY]

soutenue le : **21 Octobre 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

SEPTINES
fonctions et organisation structurale

THÈSE dirigée par :

[Mr METZGER Daniel]

Professeur, université de Strasbourg

PRESIDENT :

[Mr PENIN Julien]

Professeur, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

[Mme BERTIN Aurélie]

Docteur, Institut Marie Curie

[Mr VITOBELLO Antonio]

Docteur, INSERM, CHU Dijon Docteur,

AUTRES MEMBRES DU JURY :

[Mr WEISS Etienne]

Professeur, université de Strasbourg

[Mr ABDULRHAMAN Wassim]

Docteur, Institut Marie Curie LeadXpro

[Mr PONCIN Marc]

Directeur, Service de formation continue,
université de Strasbourg

Septines

fonctions et organisation structurale

Ecole doctorale

Sciences de la vie et de la santé

Thèse de doctorat

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Mémoire préparé sous la direction du

Pr. Daniel Metzger

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

Université de Strasbourg

Présentée et soutenue le

21 octobre 2019

Par **Mahamadou FATY**

Composition du jury

Pr. Julien Penin , *président du jury*, HDR, Université de Strasbourg

Pr. Daniel Metzger, *membre disciplinaire interne*

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg

Pr. Etienne Weiss, *membre disciplinaire interne*

Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Université de Strasbourg

Dr. Aurélie Bertin, *membre disciplinaire externe*

Responsable de projet chargée de recherche, Institut Marie Curie, Paris

Dr. Antonio Vitobello, *membre disciplinaire externe*

Ingénieur de recherche, Génétique des Anomalies du Développement (GAD) INSERM,
CHU de Dijon

Dr. Wassim Abdulrhaman, *professionnel*

Principal scientist, Head protein expression, LeadXpro

Marc Poncin

Directeur du Service de Formation Continue

Remerciements

Il me sera très difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener ce projet de doctorat à son terme.

Je voudrais tout d'abord remercier grandement mon directeur de thèse, Monsieur Daniel Metzger, Professeur à l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire à Université de Strasbourg, qui m'a encadré tout au long de la rédaction de cette thèse. Qu'il soit remercié pour toute son aide, sa gentillesse, sa disponibilité permanente et pour les nombreux conseils qu'il m'a prodigués.

Je remercie Monsieur Yves Barral, professeur et Cchef de l'institu de biochimie, ETH Zurich, dont le travail a inspiré le titre de cette thèse qui est le fruit de mon apprentissage de la recherche inspirante durant cinq années sous sa supervision. C'est à ses côtés que j'ai compris le sens de la rigueur et de la précision. Qu'il soit remercié pour sa confiance et son amitié.

Je remercie tous les membres et ex-membres de l'équipe Barral pour le climat sympathique dans lequel ils m'ont permis de travailler. Les nombreuses discussions que j'ai pu avoir avec chacun m'ont beaucoup apporté.

J'exprime tous mes remerciements à l'ensemble des membres de mon jury : Prof. Etienne Weiss, Dr. Aurélie Bertin, Dr. Antonio Vitobello, Dr. Wassim Abdulrhaman et Monsieur Marc Poncin pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

J'adresse toute ma gratitude à toutes les personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce projet. Je remercie Dr. Nicolas Thoma, Dr. Nicolas Bocquet et tous ceux avec qui j'ai partagé mes études et ma carrière scientifique.

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à ma famille et mes amis et tous ceux que je porte en mon cœur. Leur intelligence, leur confiance, leur tendresse, leur amour me portent et me guident tous les jours. Je vous aime.

Les septines forment une famille de GTPases conservée chez les champignons et dans les cellules animales [Kinoshita *et al.*, 2003]. Pendant la division cellulaire, elles se localisent aux sites de cytokinèse et sont essentielles pour ce processus dans la levure bourgeonnante, les embryons de drosophile et les cellules de mammifère en culture [Faty *et al.*, 2002].

Dans les levures bourgeonnantes, les septines, composées de réseaux parallèles de filaments [Byers *et al.*, 1976], forment un anneau au cou mère-fille. Cet anneau est étroitement associé à la membrane plasmique et constitue un échafaudage pour le recrutement de la myosine II et d'autres facteurs cytotinétiques au futur site de clivage [Longtine *et al.*, 2003]. De plus, l'anneau de septines contribue à la formation d'une barrière de diffusion latérale sur la membrane plasmique, qui aide à maintenir les facteurs de la polarité cellulaire dans le bourgeon [Barral *et al.*, 2000; Takizawa *et al.*, 2000].

Chez les métazoaires, les septines sont aussi requises pour la compartimentation du cortex cellulaire [Schmidt *et al.*, 2004; Joo *et al.*, 2005] et sont impliquées dans une myriade de processus cellulaires, y compris l'assemblage et l'orientation du corps polaire du fuseau [Kusch *et al.*, 2002; Spiliotis *et al.*, 2005], l'exocytose et le transport vésiculaire [Hsu *et al.*, 1998; Beites *et al.*, 1999], la migration cellulaire [Finger *et al.*, 2003], et l'apoptose [Larisch *et al.*, 2000; Gottfried *et al.*, 2004].

Le nombre de septines varie entre les organismes et les types cellulaires. Par exemple, il y a 7 gènes de septines chez *Saccharomyces cerevisiae*, 4 chez *S. pombe* et 13 chez l'homme [Kinoshita *et al.*, 2002; Sheffield *et al.*, 2003; An *et al.*, 2004]. L'augmentation du nombre de septines dans les cellules de mammifères pourrait refléter la grande variabilité fonctionnelle des complexes de septines dans ces organismes.

Malgré le degré de conservation élevé entre les septines, elles n'ont pas des rôles équivalents au sein des complexes. Dans chaque cas, une paire de septines forme un noyau tétramérique dans le complexe [Versele *et al.*, 2005]. Par exemple, seuls deux des cinq septines mitotiques de la levure, *Saccharomyces cerevisiae*, Cdc3 et Cdc12, sont

essentielles pour la croissance végétative, ce qui suggère qu'elles sont cruciales pour l'assemblage du complexe de septines. Les plus proches homologues de Cdc3 et Cdc12 de *S. pombe*, Spn1 et Spn4, forment également le noyau hétérotétramérique de la sous-unité de septines chez la levure de fission [An *et al.*, 2004]. De même, les septines de mammifères Sep2, Sep6 et Sep7 forment un hexamère [Kinoshita *et al.*, 2002; Sheffield *et al.*, 2003] dans lequel Sep6 et Sep7 sont orthologues de Cdc3 et Cdc12. Ainsi, malgré la variation observée entre divers complexes de septines, l'organisation moléculaire de leur noyau est un hétérotétramère conservé.

Le génome de *Caenorhabditis elegans* code deux septines, *UNC-59* et *UNC-61*, *UNC uncoordinated*. La présence des deux molécules est requise pour leurs fonctions [Nguyen *et al.*, 2000; Finger *et al.*, 2003], suggérant qu'ils agissent comme un hétéromultidimère obligatoire. Ainsi, les septines de *C. elegans*, qui sont orthologues à Cdc3 et Cdc12, représentent une sous-unité minimale de septines et offrent un puissant système pour étudier l'organisation structurale de base des complexes de septines.

Dans ce mémoire, après avoir passé en revue les fonctions essentielles des septines chez la levure bourgeonnante *Saccharomyces cerevisiae*, je présente une étude dans laquelle j'ai démontré que *UNC-59* et *UNC-61* forment un complexe hétérotétramérique capable de s'associer en structures d'ordre supérieur et en filaments dans les cellules et que le complexe hétérotétramérique de septines est assemblé à partir d'hétérodimères *UNC-59/UNC-61*. De plus, au cours d'un projet visant à développer un outil moléculaire pour l'étude des fonctions des septines *in vivo* dans des cellules sauvages de *Saccharomyces*, j'ai mis au point une méthode d'isolement *d'intrabodies* à partir de la banque d'anticorps recombinants humains en *phage display* ETH-2 et démontré leur activité d'inhibition de la formation de l'anneau de septines au col du bourgeon dans les cellules de *Saccharomyces cerevisiae*.

L'ensemble des résultats présentés met en lumière l'arrangement moléculaire des monomères dans le complexe de septines et suggère que les complexes de septines s'assemblent dans les filaments et les structures d'ordre supérieur au col du bourgeon chez *Saccharomyces cerevisiae*. Ainsi, nous proposons que les septines forment la quatrième composante du cytosquelette.

Sommaire

Liste des figures	81	
Chapitre I - Introduction	83	
1	Projet de recherche	85
1.1	Avant propos	85
1.2	Projet de recherche	85
2	Introduction générale	86
2.1	L'unité du vivant	86
2.2	Le cycle cellulaire chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	88
3	Les septines - un anneau pour séparer mère et fille	89
3.1	Avant propos	89
3.2	La croissance polarisée chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	89
3.3	Les septines chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	93
3.4	Des barrières de diffusion septines dépendantes prévention du mouvement passif	97
3.5	Rôle des septines dans le maintien de la polarité cellulaire	99
3.6	Rôle des septines en cytocinèse	100
3.7	Fonctionnement des septines chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	101
3.8	Les septines chez <i>Caenorhabditis elegans</i>	103
3.9	Conclusion	104
4	Les anticorps recombinants	104
4.1	Généralités	104
4.2	Les banques combinatoires d'anticorps	107
4.3	Le <i>phage display</i> – présentation sur phage	109
4.4	ETH-2 banque d'anticorps humains en <i>phage display</i>	115
4.5	Les <i>Intrabodies</i> – anticorps intracellulaires	116
4.6	Conclusion	122

1	Résultats publiés	
	Organisation structurale du complexe de septines UNC-59/UNC-6 : le complexe de septines de <i>Caenorhabditis elegans</i> est non polaire	127
1.1	Avant propos	127
1.2	Introduction	127
1.3	Résultats	128
1.3.1	Les septines de <i>Caenorhabditis elegans</i> forment des structures d'ordre supérieur <i>in vivo</i>	128
1.3.2	Les septines de <i>Caenorhabditis elegans</i> forment des filaments <i>in vitro</i>	131
1.3.3	La sous-unité structurale des septines de <i>Caenorhabditis elegans</i> est un hétérodimère de <i>UNC-59/UNC-61</i>	132
1.3.4	Les superhélices des septines de <i>Caenorhabditis elegans</i> forment des hétérodimères parallèles	135
1.3.5	L'hétérotétramère de septines est un complexe allongé de <i>UNC-59/UNC-61/UNC-61/UNC-59</i>	137
1.3.6	Les superhélices enroulées s'étendent latéralement à partir du noyau du tétramère de septines	140
1.4	Discussion	141
1.5	Notre modèle pour l'organisation et le fonctionnement des septines dans la levure	145
1.6	Conclusion	147
2	Résultats non publiés	
	Les anticorps recombinants intracellulaires pour disséquer les fonctions des septines de <i>C. elegans</i> et de <i>S. cerevisiae</i> <i>in vivo</i>	148
2.1	Introduction	148
2.2	Matériels et méthodes	148
2.2.1	Les souches	148
2.2.2	Les oligonucléotides	149
2.2.3	Les plasmides	149
2.2.4	Le système de fusion plasmidique univector UPS	150

2.2.5	Surexpression et purification des septines	150
2.2.6	Liaison des septines à la matrice de Sepharose	151
2.2.7	Sélection des anticorps par <i>phage display</i>	151
2.2.8	Préparation des phages après sélection	152
2.2.9	ELISA	153
2.2.10	Le double hybride	154
2.3	Résultats	154
2.3.1	Isolement et caractérisation d'anticorps recombinants anti-Cdc12 de <i>S. cerevisiae</i> , anti-Unc-59 et anti-Unc-61 de <i>C. elegans</i>	154
2.3.2	Identification de clones spécifiques par tests ELISA	155
2.3.3	Evaluation de la spécificité des anticorps recombinants isolés par le test dot blot	156
2.3.4	Etude <i>in vivo</i> de l'anticorps anti unc-61 ^{GDP} - isolement d'un <i>intrabody</i>	157
2.4	Conclusion	159
Chapitre III - Conclusions générales et perspectives		161
1	Les septines, la quatrième composante du cytosquelette	163
2	Applications des anticorps recombinants et des <i>intrabodies</i>	165
Annexes 1 et 2		167
Références bibliographiques		169

- Figure 1 :** Exemples de cellules polarisées.
- Figure 2 :** Cycle haplodiplophasique de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.
- Figure 3 :** La croissance polarisée au cours du cycle cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Figure 4 :** Polarité apicale et processus de bourgeonnement.
- Figure 5 :** Formation du bourgeon et dynamique de l'anneau de septines.
- Figure 6 :** Les septines forment des filaments dans la région d'étranglement entre une cellule de levure mère et le bourgeon.
- Figure 7 :** Immunofluorescence des septines chez *S. cerevisiae*.
- Figure 8 :** Alignement des séquences de septines.
- Figure 9 :** Formation des filaments de septines au cou du bourgeon après hydrolyse du GTP.
- Figure 10 :** Une barrière de diffusion.
- Figure 11 :** Nomenclature et nature des régions composant les anticorps monoclonaux.
- Figure 12 :** Anticorps recombinant.
- Figure 13 :** Production d'anticorps *in vivo*.
- Figure 14 :** Production *in vitro* de banques combinatoires d'anticorps.
- Figure 15 :** Phage présentant un fragment d'anticorps scFv, en tant que protéine de fusion d'une protéine d'enveloppe mineure pIII.
- Figure 16 :** Sélection de la spécificité de liaison dans une bibliothèque de présentation sur phages.
- Figure 17 :** Différents formats d'anticorps et de fragments d'anticorps.
- Figure 18 :** Représentation schématique de la banque d'anticorps humain recombinant ETH-2.

- Figure 19 :** Propriétés et modes d'action *d'intrabodies* ciblant des antigènes dans le RE (en haut) ou dans le cytoplasme (en bas).
- Figure 20 :** Les différentes stratégies de développement d'un *intrabody*.
- Figure 21 :** Localisation des septines de *C. elegans* exprimées dans les cellules de levure et d'insecte.
- Figure 22 :** Les septines de *C. elegans* forment des filaments *in vitro*.
- Figure 23 :** Analyse du complexe UNC-59/UNC-61 par chromatographie d'exclusion de taille.
- Figure 24 :** Analyse des domaines superhélices enroulées de UNC-59 et UNC-61.
- Figure 25 :** Microscopie électronique de complexes de septines.
- Figure 26 :** Moyenne de projections et image brute d'un hétérotétramère UNC-59/UNC-61 en complexe avec un fragment Fab α -His négativement colorés.
- Figure 27 :** Flexibilité du domaine en spirale.
- Figure 28 :** Organisation moléculaire du complexe hétérotétramérique de septines.
- Figure 29 :** Modèle pour l'organisation et la fonction des septines.
- Figure 30 :** Protocole suivi pour la sélection de phages spécifiques de la protéine Cdc12, Unc-59 ou Unc-61.
- Figure 31 :** Représentation schématique d'un ELISA sur puits de plaques ELISA.
- Figure 32 :** Représentation schématique d'un dot blot.
- Figure 33 :** Principe du double-hybrides.
- Figure 34 :** Nombre de cellules *Saccharomyces cerevisiae cdc12-6* à température restrictive avec un anneau de septines correctement formé au cou du bourgeon.

1 Projet de recherche

1.1 Avant propos

Les travaux présentés dans ce mémoire sont le fruit de 5 ans passés dans le laboratoire du Prof. Yves Barral à l'institut de biochimie de l'ETH à Zurich en Suisse.

En janvier 2000, j'ai rejoint le groupe du Pr. Y. Barral au poste d'associé de recherche, de gestionnaire de laboratoire, des achats et ressources, jusqu'au mois de mai 2005.

1.2 Projet de recherche

Depuis l'identification initiale des septines au début des années 1970, les recherches dans ce domaine se sont considérablement développées, en particulier lorsque l'on prend en compte le nombre et la diversité des septines qui ont été caractérisées d'une espèce à l'autre [Lindsey *et al.*, 2006]. Cette recherche a conduit à des questions très intéressantes liées à la structure et à la fonction des septines. La détermination des mécanismes d'assemblage des unités de septines, des complexes et des filaments de septines s'est avéré être primordiale pour élucider la myriade de propriétés et de fonctions des septines dans la cellule.

L'idée d'utiliser des anticorps pour cibler de manière très précise des toxines ou des radio-isotopes sur des types de cellules a près de cent ans [Erlich *et al.*, 1957]. Grâce aux travaux de Greg Winter et ses collègues et la technologie du *phage display*, à la fin des années 80, des méthodologies ont été développées pour produire et purifier des fragments d'anticorps actifs dans *E. coli* ce qui a ouvert la voie au concept *d'intrabody* qui repose sur l'expression d'un fragment d'anticorps à l'intérieur d'une cellule afin de lier la protéine ciblée par ce fragment. Par leur capacité de bloquer fonctionnellement et spécifiquement une protéine endogène, les anticorps intracellulaires représentent une nouvelle possibilité [Biocca *et al.*, 1994 ; Richardson *et al.*, 1995] de « *knock-out* » d'une protéine.

Le premier chapitre de cette thèse, « Introduction », me permet de présenter, par bibliographie, le contexte scientifique et stratégique dans lequel s'était inscrit l'ensemble de mes travaux de recherche. L'objectif de mon projet de thèse a donc été de recenser dans ce « chapitre I » les fonctions des septines en actualisant les informations de la revue que j'ai publiée en 2002 [annexe1]. J'ai ensuite introduit les généralités

concernant les anticorps recombinants et les anticorps intracellulaires ou *intrabodies* ainsi que le système des banques combinatoires d'anticorps en exposition à la surface de phages, *phage display*, afin de suggérer leurs puissances en tant qu'outil de recherche fondamentale et biomédicale.

Dans le chapitre II, « Résultats », je présente les résultats obtenus et publiés [annexe2] lors des travaux dont le but était la détermination de l'unité structurale des complexes de septines à la base des structures d'ordre supérieur et des filaments dans la cellule par utilisation d'une combinaison de méthodes de biologie cellulaire, de biochimie et de microscopie électronique. Puis, je présente les résultats de travaux non publiés. Afin de disséquer les fonctions des septines de *Saccharomyces cerevisiae in vivo*, j'ai travaillé à mettre au point une stratégie expérimentale d'isolement d'*intrabodies* recombinants dirigés contre la septine CDC12 de *Saccharomyces cerevisiae* et contre UNC-61 de *Caenorhabditis elegans* afin de perturber leurs fonctions chez *S. cerevisiae*. J'ai ainsi pu produire un outil moléculaire d'investigation indépendant de l'utilisation de mutants ou de la sur-expression de protéines sauvage et mutante. Pour ces travaux, j'ai eu recours à la banque combinatoire d'anticorps recombinants humains ETH-2 en *phage display* et à une série d'évaluations *in vitro* et *in vivo* afin de sélectionner les anticorps les plus neutralisants *in vivo*.

Dans mes travaux de recherche, j'ai utilisé l'organisme modèle du laboratoire, la levure bourgeonnante *Saccharomyces cerevisiae*, et les septines clonées de *Caenorhabditis elegans* UNC-59 et UNC-61.

Enfin, dans le chapitre III, « Conclusions générales et perspectives », j'expose les arguments qui font des septines la quatrième composante du cytosquelette avant de finir sur les applications prometteuses des anticorps recombinants et des *intrabodies*.

2 Introduction générale

2.1 L'unité du vivant

Au delà de la biodiversité des organismes, il existe une unité du vivant. De nombreux mécanismes homologues sont retrouvés dans des organismes phylogénétiquement et morphologiquement éloignés [Drubin *et al.*, 1996].

Un phénomène essentiel conservé au cours de l'évolution est la capacité des

cellules à se polariser (Figure 1), permettant ainsi l'acquisition d'une morphologie spécifique, la migration cellulaire ou encore un trafic intracellulaire polarisé [Ridley *et al.*, 2001] pour maintenir les fonctions des divers types cellulaires.

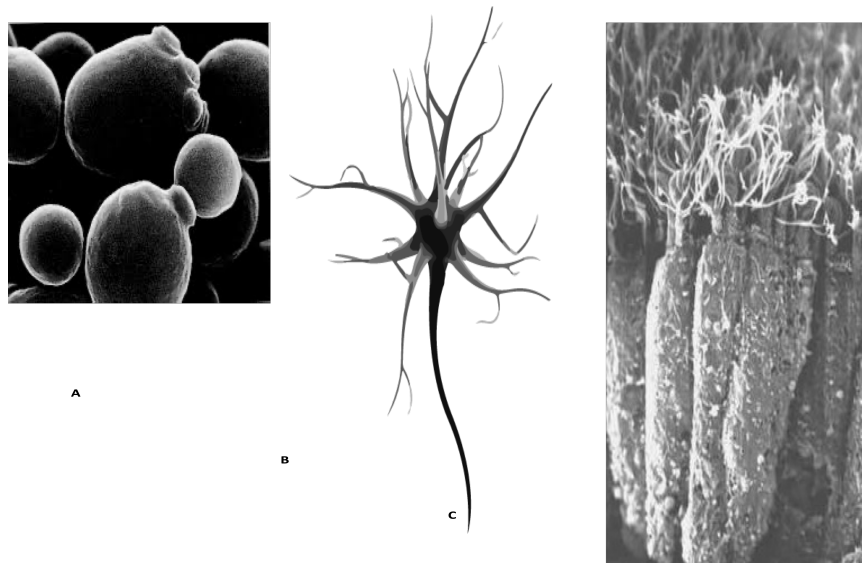


Figure 1: Exemples de cellules polarisées.

(A) Cellules bourgeonnantes de levure *S. cerevisiae* (Wheal EA, Max Plank Institut). **(B)** Neurones. **(C)** Cellules épithéliales de revêtement.

Chez les métazoaires la mise en œuvre de ce phénomène conduit à la formation d'un individu composé de nombreux types cellulaires distincts, avec des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles très différentes à partir de cellules totipotentes embryonnaires non différenciées.

La polarité cellulaire est une résultante de l'action coordonnée de différents mécanismes dont les caractéristiques principales sont globalement conservées au cours de l'évolution. Ces mécanismes font intervenir les composants hautement dynamiques et polarisés du cytosquelette qui se réorganise continuellement en réseaux élaborés de filaments dans le cytoplasme et sur la face interne du cortex cellulaire, support mécanique de la membrane plasmique. Cette dynamique d'organisation est en réponse à des signaux spécifiques comme des facteurs solubles, la présence d'autres cellules ou des interactions avec la matrice extracellulaire, tout au long du cycle cellulaire.

Deux membres très étudiés du cytosquelette sont l'actine et les microtubules. Ils sont les supports du trafic entre les différents compartiments intracellulaires et vers l'extérieur, notamment le transport de vésicules et de leur ciblage vers des zones définies de la cellule. Ils sont également les câbles essentiels à la ségrégation des

chromosomes [Watanabe *et al.*, 2004]. Les membres du cytosquelette comprennent aussi les filaments intermédiaires qui fournissent la force mécanique et la résistance au cisaillement, le maintien de l'intégrité cellulaire et tissulaire.

Tous les éléments du cytosquelette sont des structures protéiques allongées, organisées en réseaux, faisceaux ou câbles qui résultent de la polymérisation d'éléments monomériques, suivant les rôles qu'ils remplissent [Chabadel *et al.*, 2007].

2.2 Le cycle cellulaire chez *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae est capable de se multiplier sous deux formes : une forme diploïde avec 2 jeux de chromosomes, $2n = 32$ chromosomes, et une forme haploïde, $1n = 16$ chromosomes [Lefief-Delcourt *et al.*, 2016] (Figure 2).

Les cellules haploïdes se multiplient en bourgeonnant. La cellule mère effectue une mitose qui aboutit à une cellule fille plus petite, mais possédant la même information génétique.

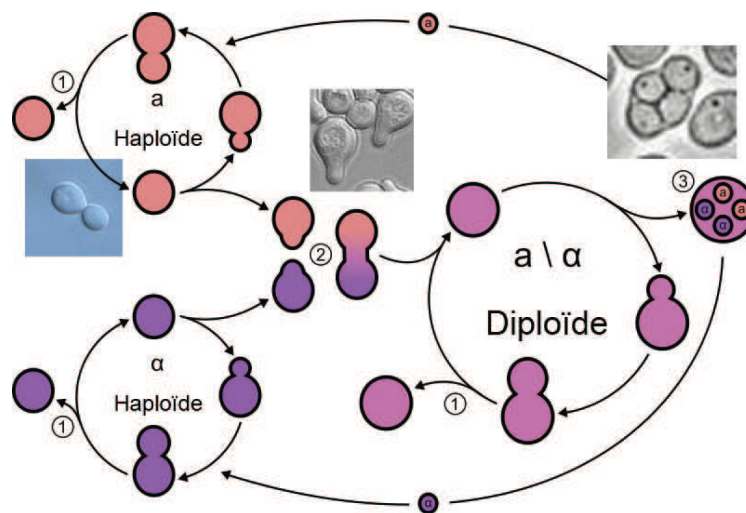


Figure 2 : Cycle haplodiplophasique de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

1. Croissance végétative à l'état haploïde ou diploïde par bourgeonnement, **2.** Fusion de deux cellules haploïdes de signe sexuel opposé a et α et formation d'un zygote diploïde. On peut aisément distinguer au microscope les formes « shmoo » des zygotes ou des formes bourgeonnantes, **3.** Sporulation des cellules diploïdes et formation d'asques contenant 4 spores issues d'une cellule diploïde ayant subi la méiose. D'après Klar *et al.*, 2010.

Il existe des cellules haploïdes « a » et des cellules haploïdes « α » qui correspondent à des signes sexuels distincts. Ces deux types de cellules ne se distinguent pas morphologiquement mais par la phéromone qu'elles produisent : MAT a ou MAT α . Les phéromones libérées permettent l'amorce du processus de conjugaison en se liant à

un récepteur spécifique de la cellule de signe opposé. Ensuite, la fusion entre une cellule «*a*» et une «*α*» donne naissance à une cellule diploïde «*a/α*». Tant que l'environnement est favorable, le diploïde se multiplie par bourgeonnement. Si les nutriments viennent à manquer, la cellule repasse en phase haploïde par un processus de méiose. On obtient alors quatre noyaux haploïdes qui sont inclus dans les spores ou ascospores, contenues dans un sac appelé asque. L'enveloppe de l'asque se rompt à maturité et libère alors deux cellules «*a*» et deux cellules «*α*» qui peuvent recommencer le cycle [Klar *et al.*, 2010].

3 Les septines - un anneau pour séparer mère et fille

3.1 Avant propos

Avec l'aide d'un étudiant en licence sous ma supervision, j'ai écrit une revue publiée en 2002 [annexe 1] pour faire le point sur les fonctions et les propriétés des septines et dessiner les contours des futurs projets du laboratoire du Prof. Y. Barral à l'ETH de Zurich. Dans ce mémoire, après avoir ajouté un point historique sur la découverte des septines de *Saccharomyces cerevisiae*, je présente les fonctions des septines en reprenant les chapitres de cette revue [annexe 1] et en actualisant les informations en regard des publications plus récentes à retrouver dans la liste des références bibliographiques en fin de mémoire.

Publication : **Faty M**, Fink M, Barral Y (2002) *Septins: a ring to part mother and daughter*. *Curr Genet. Jun*; 41(3):123–31. [annexe 1]

3.2 La croissance polarisée chez *Saccharomyces cerevisiae*

La localisation asymétrique des protéines corticales joue un rôle clé dans de nombreux processus cellulaires, telle que la morphogenèse et la détermination du devenir cellulaire. Par le terme «cortical», nous entendons la membrane plasmique et les structures intracellulaires qui lui sont étroitement associées.

Chez la levure *S. cerevisiae* (Figure 3), la polarité cellulaire est mise en œuvre lors de la croissance végétative [Huffaker *et al.*, 1987; Lew *et al.*, 1995; Snyder *et al.*, 1998]. Durant cette croissance, la cellule mère se polarise en direction du bourgeon

jusqu'à la fin de la phase S. La croissance du bourgeon s'arrête pendant la phase G2 et les cellules se séparent lors de la phase mitotique.

Lors de la croissance sexuée la polarité cellulaire est également nécessaire. La cellule haploïde se déforme en réponse à la phéromone sexuelle de signe opposé et émet un prolongement, aboutissant à une forme particulière de la cellule, appelée « shmoo », afin de fusionner avec la cellule de signe sexuel opposé [Narayanaswamy *et al.*, 2009].

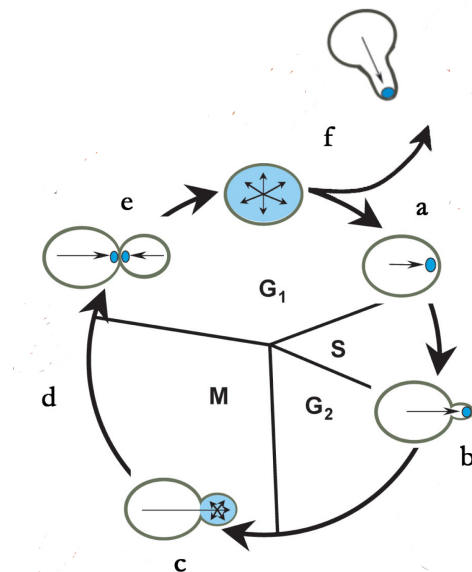


Figure 3 : La croissance polarisée au cours du cycle cellulaire de *S. cerevisiae*. La polarité est illustrée en bleu et les flèches représentent la croissance polarisée. **a**. Établissement de la polarité cellulaire en G₁. **b**. Croissance apicale du bourgeon. **c**. Le changement de la polarité favorise la croissance isotropique du bourgeon. **d**. La croissance du bourgeon terminée. **e**. Au moment de la division cellulaire, le septum se forme et les cellules se séparent. **f**. La cellule fille connaît alors une période de croissance isotropique. **g**. La présence de phéromones arrête la croissance en G₁ et la cellule forme un *shmoo* permettant la conjugaison avec un partenaire de type sexuel opposé. D'après Pruyne et Betscher, 2000.

La polarité corticale peut prendre deux formes. Lorsque l'asymétrie s'organise autour d'un point sur la surface cellulaire, on observe la formation d'un gradient de distribution de protéines autour du centre ou pôle de la polarisation (Figure 4A, partie a). Certains facteurs deviennent plus abondants autour du pôle, tandis que d'autres peuvent avoir une distribution inverse. Il s'agit, dans ce cas, de la polarité apicale. Alternativement, le cortex peut également être organisé en domaines séparés par des limites précises (Figure 4A, partie b). Il s'agit de la compartimentation corticale.

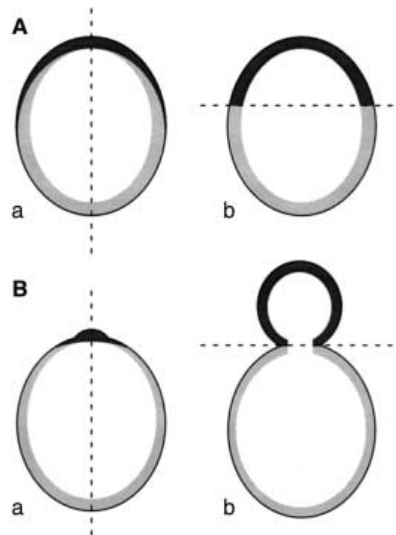


Figure 4 : Polarité apicale et processus de bourgeonnement.

(A) La polarité apicale peut prendre deux formes. **a** La distribution des composants corticaux sont organisés en dégradé autour d'un pôle. La concentration des facteurs polarisés atteint son maximum au pôle, tandis que d'autres facteurs peuvent avoir la distribution inverse. C'est ce qu'on appelle polarité apicale. **b** Les composants corticaux peuvent être distribués asymétriquement en deux compartiments distincts séparés par une limite nette. Dans ce cas, les composants des compartiments distincts ne se mélangent jamais. C'est ce qu'on appelle la compartimentation corticale. **(B)** Le processus de bourgeonnement présente successivement les deux formes de polarité. Pendant l'émergence des bourgeons, la polarité est organisée autour du site du bourgeon naissant (**a**). Après le passage à la croissance isotrope des bourgeons, le cortex de la levure est clairement compartimenté en cortex mère et bourgeon (**b**). D'après Faty *et al.*, 2002 (annexe 1).

Le maintien d'un gradient, dans le cas de polarité apicale, suppose le maintien d'un organisateur ponctuel (Figure 4B, partie a). En revanche, le maintien des compartiments nécessite que des structures spécifiques définissent les limites du compartiment et empêchent le mélange des compartiments (Figure 4B, partie b). Chez *S. cerevisiae* les septines sont impliquées dans les deux formes de polarité corticale.

La polarité apicale est observée pendant l'émergence du bourgeon (Figure 5A, partie b) et la formation d'une projection d'accouplement (Figure 5B). Mais dans la majorité du temps de la croissance du bourgeon, la polarité corticale repose sur la compartimentation corticale de la cellule mère et du cortex du bourgeon (Figure 5A, partie c) [Giot *et al.*, 1997 ; Barral *et al.*, 2000; Gladfelter *et al.*, 2001]. Les septines sont impliquées dans le maintien de la polarité cellulaire dans les deux cas, la projection d'accouplement et la croissance du bourgeon.

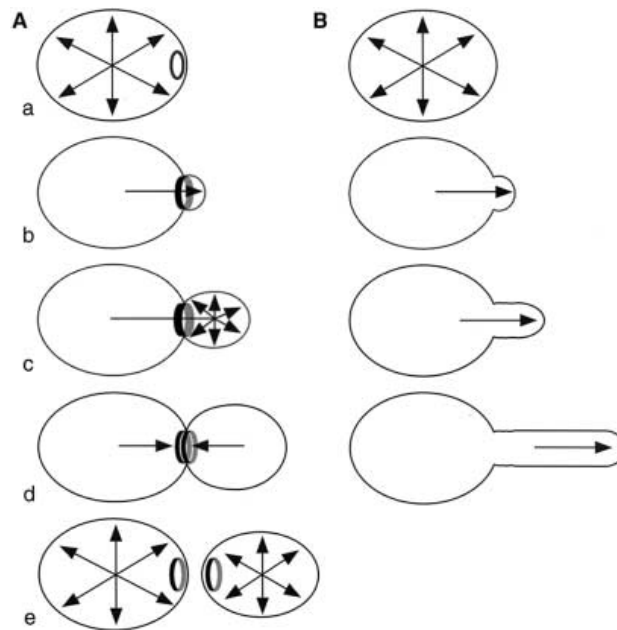


Figure 5 : Formation du bourgeon et dynamique de l'anneau de septines.

(A) La formation du bourgeon nécessite la polarisation de la croissance cellulaire. **a** L'anneau de septines se forme avant l'apparition du bourgeon. À cette étape la croissance cellulaire est isotrope dans la cellule non bourgeonnante. **b** A l'émergence du bourgeon, la croissance cellulaire se polarise vers le site du bourgeon qui devient la pointe du bourgeon au fur et à mesure que le bourgeon émerge. Les septines forment un anneau au cou du bourgeon. **c** Peu après l'émergence du bourgeon, la croissance du bourgeon passe du mode apical au mode isotrope. À ce stade, la cellule mère a cessé de croître. L'anneau de septines montre peu de changement. **d** Après la division nucléaire, l'anneau de septines se divise en deux anneaux. La croissance cellulaire est redirigée vers le cou pour la formation du septum. **e** Après la séparation cellulaire, la croissance cellulaire devient isotrope dans les cellules mères et filles. Chaque cellule a hérité d'un anneau de septines, qui reste pendant la majeure partie de G1, jusqu'à ce qu'un nouvel anneau se forme sur le nouveau site du bourgeon naissant. **(B)** Dans les cellules sans anneau de septine, un point de contrôle du cycle cellulaire empêche la transition de la croissance apicale à la croissance isotrope du bourgeon. En conséquence, la cellule forme un bourgeon allongé. D'après Faty *et al.*, 2002 (annexe 1).

Les mécanismes mis en jeu lors de la croissance polarisée sont observables tout au long du cycle cellulaire. Lors de la phase G1, les marqueurs de bourgeonnement sont positionnés au futur site de bourgeonnement. Grâce à ces marqueurs, l'émergence du bourgeon est initiée. Une série de structures corticales dynamiques du cytosquelette vont se coordonner essentiellement dans la zone d'émergence du bourgeon et permettre sa croissance.

La croissance apicale est régulée par un ensemble de protéines qui coordonnent les réarrangements du cytosquelette, la sécrétion polarisée et le remodelage de la paroi. Notamment, les faisceaux d'actine au niveau du bourgeon sont émis vers le cortex de la cellule mère. Ils sont utilisés comme rails par le transport vésiculaire et participent, avec le cytosquelette de microtubules, à l'orientation du fuseau mitotique et la

ségrégation du noyau.

Lorsque le bourgeon a atteint une taille critique, la croissance polarisée vers l'apex du bourgeon s'arrête et favorise la croissance isotropique du bourgeon et la mise en place, au cou du bourgeon, de l'anneau contractile d'actomyosine, acteur de la séparation des cellules mère qui émettent les bourgeons et les bourgeons qui deviendront les cellules filles [Imamura *et al.*, 1997].

3.3 Les septines chez *Saccharomyces cerevisiae*

En 1971, Lee Hartwell et ses collègues ont identifié les gènes des septines, nommées ainsi pour indiquer leur rôle dans la septation et la division cellulaire, dans leur criblage de mutations sensibles à la température affectant la division cellulaire de la levure bourgeonnante, mutants *cdc*, cycle de division cellulaire [Hartwell *et al.*, 1970, 1971 1974]. Des mutations conditionnelles dans l'un des quatre gènes des septines *CDC3*, *CDC10*, *CDC11* et *CDC12* empêchent la cytokinèse [Hartwell, 1971], dernière étape de la division cellulaire, mais les cellules continuent tout de même de bourgeonner, la synthèse d'ADN et la division nucléaire se poursuivent. Ceci entraîne, à température restrictive, l'accumulation de grandes cellules multinucléées avec plusieurs bourgeons allongés.

En 1976, Byers et Goetsch ont identifié, par microscopie électronique, un ensemble, d'aspect strié, très ordonné, de filaments de 10 nm étroitement associés à la membrane plasmique au cou mère-fille de *Saccharomyces cerevisiae* bourgeonnant (Figure 6).

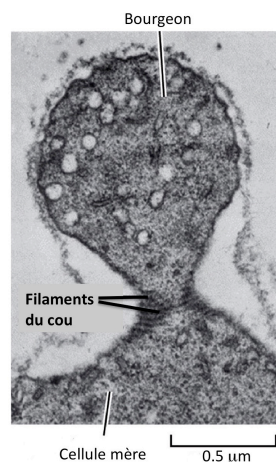


Figure 6 : Les septines forment des filaments dans la région d'étranglement entre une cellule de levure mère et le bourgeon. D'après Byers et Goetsch, 1976.

Ces filaments sont parallèles entre eux et au plan du cou. Ils apparaissent peu après l'émergence des bourgeons et disparaissent avant à la cytokinèse. Les techniques d'immunofluorescence ont montré que les septines forment un anneau au col mère-bourgeon (Figure 7) [Haarer *et al.*, 1987; Kim *et al.*, 1991; Longtine *et al.*, 1996; Champ *et al.*, 1999]. Dans les mutants *cdc3*, *cdc10*, *cdc11*, and *cdc12* placés à température restrictive, l'anneau de septines n'est pas visible. Dans certains allèles de *cdc10* et de *cdc12* l'anneau de septines visible à temperature permissive disparaît rapidement après passage à temperature restrictive. Ces données indiquent que les septines sont interdépendantes pour leur localisation [Adams *et al.*, 1984].

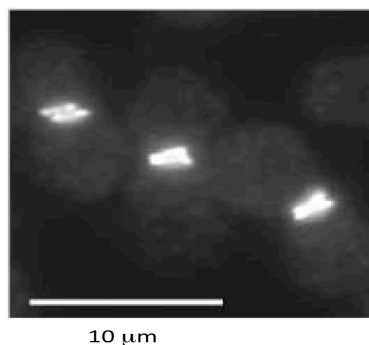


Figure 7 : Immunofluorescence des septines chez *S. cerevisiae*. D'après Gladfelter *et al.*, 2005.

Ces résultats suggèrent que Cdc3p, Cdc10p, Cdc11p et Cdc12p, identifiées par spectrométrie de masse, de poids moléculaire de 70 kDa, 63 kDa, 50 kDa et 37 kDa respectivement, sont les principales composantes des filaments au cou du bourgeon. Les études biochimiques soutiennent fortement ce point de vue [Field *et al.*, 1996 ; Frazier *et al.*, 1998 ; Oegema *et al.*, 1998]. Les quatre protéines de septines co-purifient sur des colonnes d'affinité et les complexes purifiés sont composés des quatre polypeptides des septines plus une cinquième molécule de septine de 51 kDa identifiée plus tard, Sept7 [Carroll *et al.*, 1998]. Ce complexe protéique purifié est capable de s'auto-associer *in vitro* pour former des structures d'ordre supérieur filamenteuses.

Capables de s'associer en complexe annulaire, ou septum, au niveau de la zone de séparation des deux cellules, et de former des anneaux et des réseaux servant de support pour de nombreux facteurs de la polarité cellulaire et de la cytokinèse, les septines sont, pour cette raison, considérées comme formant une quatrième composante du cytosquelette, dont les filaments ont un diamètre de 7 à 10 nm et une

longueur de 32 à 100 nm [Frazier *et al.*, 1998]. L'analyse de micrographies de filaments purifiés confirme la possibilité que les filaments de septines sont parallèles à l'axe mère-bourgeon. Dans ce modèle, les structures de 10 nm observées dans les cellules de levure peuvent être formées par association latérale de filaments de septines [Frazier *et al.*, 1998 ; Longtine *et al.*, 1998; Gladfelter *et al.*, 2001].

L'alignement de toutes les séquences de septines de *S. cerevisiae* identifiées et de *C. elegans* montre qu'elles sont composées de trois domaines majeurs (Figure 8). L'identité minimale des septines comparées les unes aux autres sur toute la longueur de leurs séquences est au moins de 26% [Cooper *et al.*, 1996; Kellogg *et al.*, 1999].

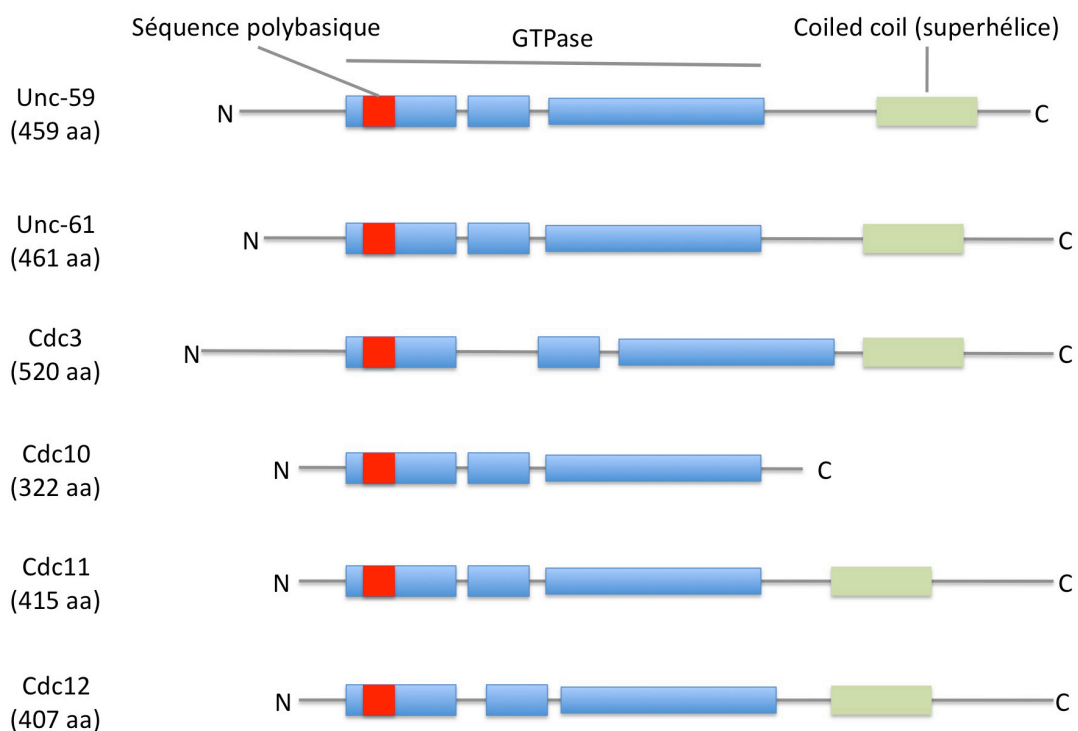


Figure 8 : Alignement des séquences de septines.

Les séquences de septines suivantes ont été alignées: *Caenorhabditis elegans* (Unc-61, Unc-59), *Saccharomyces cerevisiae* (Cdc3, Cdc10, Cdc11, Cdc12). D'après Faty *et al.*, 2002 [annexe 1].

La similitude est la plus grande dans le domaine central, avec plus de 35% d'identité. Ce domaine qui contient des consensus G1 (GxxxxGK[S/T]), G3 (DxxG) et G4 (xKxD) [Field *et al.*, 1999], retrouvés chez les petites GTPases, guanosine triphosphate hydrolases, et les ATPases, adénosine triphosphate hydrolase, lie et hydrolyse le GTP [Saraste *et al.*, 1990; Flescher *et al.*, 1993; Cooper *et al.*, 1996; Field *et al.*, 1999]. Le motif G1 forme une boucle flexible qui interagit avec le groupement phosphate du GTP. Le motif G3 se lie à l'ion Mg^{2+} et peut interagir avec les phosphates b et g du GTP. Le motif

G4 semble important pour la spécificité de liaison au GTP [Cao *et al.*, 2009]. Par analogie avec l'actine et la tubuline, la liaison au nucléotide peut être impliquée dans le contrôle de l'assemblage et de la fonction des septines. Les travaux de M. Versele et J. Thorner en 2004 vont dans cette direction et indiquent la participation de la phosphorylation de Cdc3 et Cdc10 par la protéine Cla4 membre de la famille des kinases PAK connue pour être impliquée entre autres dans la formation de l'anneau de septines, au cours de la cytokinèse (Figure 9).

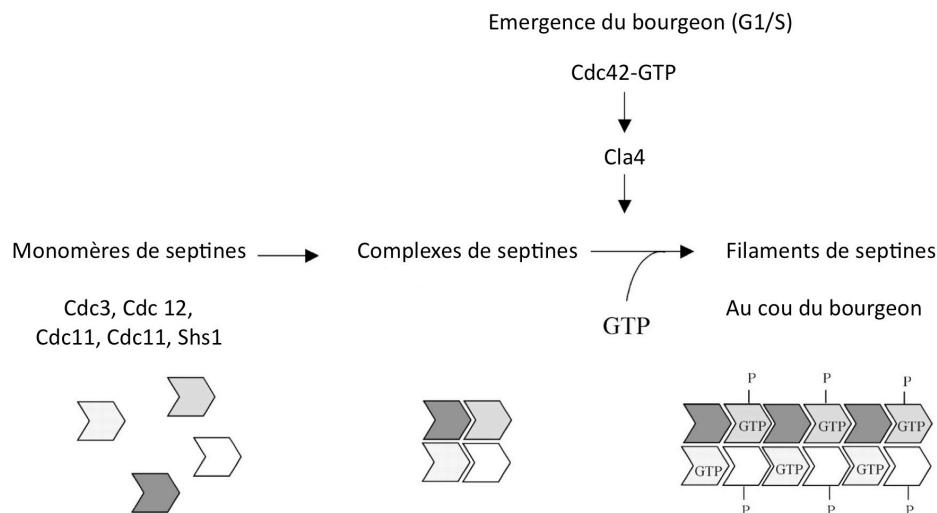


Figure 9 : Formation des filaments de septines au col du bourgeon après hydrolyse du GTP
D'après Versele *et al.*, 2004.

Précédant le domaine GTPase, le domaine polybasique est responsable de l'association des septines avec les phospholipides des membranes cellulaires [Cao *et al.*, 2009; Peterson *et al.*, 2010; Trimble *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999] comme il a été démontré dans le cas de la septine de mammifère, H5 [Zhang *et al.*, 1999].

L'extrémité C-terminale des septines, varie en longueur et en composition d'acides aminés et contient des domaines en superhélice a appelés « *coiled-coil* » (Figure 8). A cet égard, la septine Cdc10 de *S. cerevisiae* est exceptionnelle en ce qu'elle manque de cette région en superhélice. Ce domaine C-terminal est impliqué dans des interactions homotypiques et hétérotypiques [Longtine *et al.*, 1996].

Le domaine N-terminal est également très variable parmi les septines et contient des séquences riches en proline.

3.4 Des barrières de diffusion septines dépendantes - prévention du mouvement passif

La levure a la particularité de réaliser une mitose fermée, c'est à dire que la membrane nucléaire reste intègre pendant la mitose. Le noyau de la levure en anaphase se positionne au niveau du cou, avec une partie dans la cellule mère et l'autre dans le bourgeon (Figure 10) [Caudron, 2009]. La membrane nucléaire externe de la cellule mère et celle de la future cellule fille sont séparées par une barrière de diffusion [Shcheprova *et al.*, 2008]. Chez *S. cerevisiae*, il existe, en plus de la barrière nucléaire, des barrières de diffusion dépendant des septines dans la membrane plasmique et dans le réticulum endoplasmique.

La compartimentation des membranes par des barrières de diffusion permet d'établir la différenciation de la cellule mère et de la cellule fille.

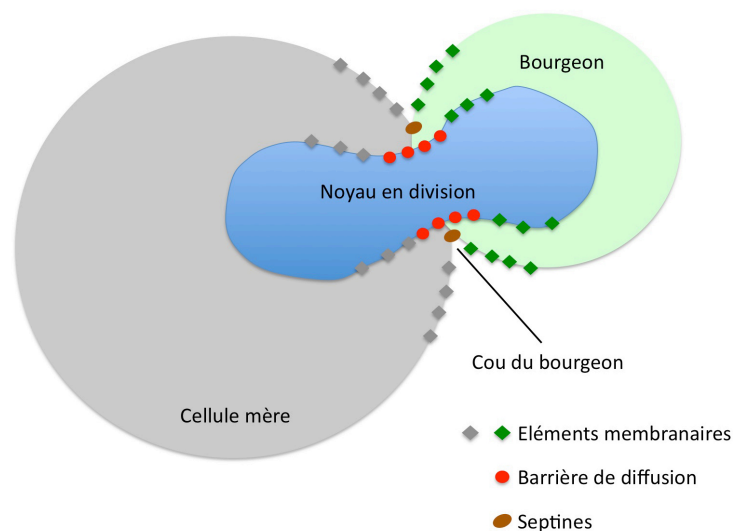


Figure 10 : Une barrière de diffusion.

Schéma d'une levure en anaphase (noyau en bleu). Les septines (marron) dirigent la formation d'une barrière de diffusion (points rouge) dans la membrane nucléaire externe. Les éléments membranaires (gris ou vert) restent dans la cellule mère ou dans le bourgeon. D'après Caudron, 2009.

En 2000, Les équipes de Y. Barral et de P.A. Takizawa ont montré que l'anneau de septines au cou du bourgeon agit comme une barrière de diffusion nécessaire pour restreindre la diffusion de la membrane et des facteurs associés à la membrane à des régions spécifiques de la cellule en orchestrant les interactions entre la membrane plasmique et les composantes du cytosquelette [Barral *et al.*, 2000; Takizawa *et al.*, 2000].

Le rôle des septines comme barrière de diffusion est également important pendant la reproduction sexuée de la levure. En réponse aux phéromones, les partenaires d'accouplement utilisent une croissance polarisée pour prolonger une projection l'un vers l'autre et fusionner. En l'absence de septines fonctionnelles, les cellules sont incapables de former les projections polarisées étendues l'une vers l'autre pour fusionner [Giot et Konopka, 1997]. Ce défaut conduit à une réduction de l'efficacité avec laquelle les partenaires entrent en contact et fusionnent.

Deux séries de preuves indiquent que l'anneau de septines empêche la diffusion passive des facteurs corticaux à travers le cou du bourgeon.

Premièrement, lorsque les cellules *cdc12-6* sont traitées avec du cycloheximide pour empêcher la synthèse protéique *de novo* avant un passage à température restrictive, les marqueurs de polarité se redistribuent entre le bourgeon et la cellule mère [Barral *et al.*, 2000]. Dans la même expérience, les cinétiques de redistribution ne sont pas affectées dans les cellules non traitées. La cycloheximide ne déclenche pas la redistribution des protéines dans les cellules de type sauvage, où l'anneau de septines reste stable. Le *pool* de protéines de polarité qui se re-localise dans la cellule mère lors de la perturbation de l'anneau de septines n'est pas due à une synthèse *de novo* des protéines, mais provient du bourgeon. En absence d'un anneau de septines, ces protéines diffusent librement dans la cellule mère et, dans les cellules de type sauvage, l'anneau de septines empêche cette diffusion [Barral *et al.*, 2000]. Ces résultats suggèrent que, une fois l'asymétrie établie, l'anneau de septines au cou entre la cellule mère et le bourgeon interdit la diffusion retour des protéines associées à la membrane dans le compartiment maternel.

Takizawa et ses collègues ont rapporté une seconde ligne de preuves pour la formation d'une barrière de diffusion septines-dépendante. Dans cette expérience, la protéine membranaire Ist2p [Entian *et al.*, 1999] est montrée se localiser spécifiquement dans la membrane plasmique du bourgeon. GFP-Ist2p localise comme Ist2p. Le photo-blanchiment d'un segment de membrane plasmique dans le bourgeon de cellules exprimant GFP-Ist2p a montré que la récupération de fluorescence était rapide. La récupération n'était pas due à la synthèse protéique *de novo*, puisque la synthèse de la protéine GFP-Ist2p a été inhibée par le cycloheximide avant le photo-blanchiment. Ainsi, Ist2p diffuse librement dans le plan de la membrane plasmique. Pourtant, il ne

traverse pas le cou du bourgeon, car il ne se retrouve pas au niveau de la membrane plasmique de la cellule mère. Une barrière de diffusion est donc présente au niveau du cou du bourgeon. Dans le mutant *cdc12-6*, GFP-Ist2p reste dans la membrane plasmique du bourgeon tant que les cellules sont cultivées à température permissive. A température restrictive, l'anneau de septines est perturbé et GFP-Ist2p se redistribue rapidement à la surface des compartiments du bourgeon et de la cellule mère. La présence de l'anneau de septines est donc nécessaire pour former la barrière de diffusion au cou du bourgeon.

Il reste à déterminer si les septines agissent par le recrutement de molécules spécialisées au col qui, à leur tour, assurent une fonction de barrière, ou si les septines elles-mêmes forment la barrière de diffusion. Les mutations qui affecteraient spécifiquement la fonction de barrière devraient conduire à la formation de petits bourgeons et de grandes cellules mères. Malgré des études approfondies, aucune protéine associée aux septines n'a été isolée dont l'absence conduirait à un tel phénotype. Les septines elles-mêmes sont donc les meilleures candidates pour assumer la fonction de barrière de diffusion.

Il est devenu évident que les septines sont conservées bien au-delà des champignons [Neufeld *et al.*, 1994 ; Cooper *et al.*, 1996]. Les barrières de diffusion septines dépendantes ne sont pas spécifiques aux levures. Par exemple, une barrière du segment initial est nécessaire pour que l'axone des neurones se différencie du compartiment somato-dendritique [Hedstrom *et al.*, 2008]. De plus, les septines forment des barrières de diffusion à la base des épines dendritiques, et dans la queue des spermatozoïdes. Ces barrières de diffusion sont donc nécessaires à la différenciation et la maturation des compartiments qu'elles délimitent.

3.5 Rôle des septines dans le maintien de la polarité cellulaire

Les septines agissent dans le maintien de la polarité cellulaire en assurant la séquestration de l'exocyste et du polarisome. L'exocyste est le complexe d'arrimage des vésicules à la membrane plasmique. Le polarisome, composé des protéines, Spa2p, Sph1p, Bud6p, Bni1p et Pea2p, forme un lien entre les facteurs d'établissement de la polarité cellulaire et les câbles d'actine [Pruyne *et al.*, 2000], dans le bourgeon pendant la croissance isotrope [Barral *et al.*, 2000].

Dans le mutant conditionnel *cdc12-6*, l'anneau de septines se désassemble rapidement à température restrictive. Dans ces cellules, le marqueur du polarisome, Spa2, et les marqueurs d'exocystes, Sec3p [Finger *et al.*, 1997] et Sec5p [TerBush *et al.*, 1996], ne sont plus exclus de la cellule mère. La plupart des facteurs testés jusqu'à ce jour [Barral *et al.*, 2000; Takizawa *et al.*, 2000] nécessitent la fonction des septines pour le maintien de leur localisation correcte dans le bourgeon au cours de la croissance isotrope. En conséquence, les cellules qui passent à la croissance isotrope sans avoir un anneau de septines au cou du bourgeon sont incapables de limiter l'exocytose et la croissance au bourgeon. Par contre, lors de la croissance apicale, lorsque la polarité est organisée autour de la pointe de bourgeon, l'absence de l'anneau de septines n'affecte pas la localisation des marqueurs corticaux et la croissance.

Ces résultats suggèrent que l'anneau de septines peut agir au niveau du cou du bourgeon comme une barrière, en empêchant la diffusion latérale des facteurs associés à la membrane le long de la membrane plasmique dans la cellule mère.

3.6 Les septines en cytocinèse

C'est à travers leur rôle dans la division cellulaire chez la levure *S. cerevisiae* que les septines ont été le plus étudiées. Dans cet organisme, la cytocinèse est le résultat de deux processus superposés : la contraction de l'anneau d'actomyosine et la formation du septum par fusion de vésicules avec la membrane plasmique [Epp *et al.*, 1997 ; Bi *et al.*, 1998; Lippincott *et al.*, 1998; Vallen *et al.*, 2000]. Dans la plupart des souches de levure, une perturbation de l'un de ces processus conduit à un retard de la cytocinèse, mais pas à un échec total de la séparation cellulaire [Vallen *et al.*, 2000]. En revanche, la perturbation de la fonction des septines altère totalement la cytocinèse. Puisque tous les processus de la cytocinèse dépendent de leur fonction, les septines doivent sans doute agir au niveau le plus en amont de la voie cytotinétique de la levure.

Dans les cellules fongiques et animales, la cytocinèse repose sur la sélection d'un plan de clivage au niveau du cortex cellulaire. Chez la levure, le plan de clivage est nécessairement localisé au niveau du cou du bourgeon. Il est établi au point d'émergence des bourgeons longtemps avant la cytocinèse et cet emplacement doit rester marqué durant la majorité du cycle cellulaire. Fait intéressant, l'anneau de septines se forme au point présumé d'émergence du bourgeon [Kim *et al.*, 1991]. Nous pouvons donc émettre la simple hypothèse que les septines forment un échafaudage rigide [DeMarini *et al.*,

1997] qui marque et maintient la position du bourgeonnement axial par recrutement de protéines importantes pour la spécification du site de division, comme Bud4p [Longtine *et al.*, 1996], permettant la mise en place et le maintien de la machinerie de clivage à ce site.

La fonction des septines serait donc de maintenir la mémoire de la position du col du bourgeon pendant la croissance de celui-ci. Tandis que les organelles, les microfilaments et microtubules se déplacent rapidement dans le cytoplasme, ce modèle anticipe que la dynamique des septines doit être beaucoup plus lente que celle des autres structures cytosquelettiques.

Maintenir une position stable dans un environnement en changement constant suppose un fort ancrage. Il serait difficile de concevoir comment les septines peuvent accomplir cette tâche si elles n'étaient pas attachées les unes aux autres et/ou à d'autres structures cellulaires ou extra-cellulaires stables. Même si d'autres processus peuvent également participer à la stabilité de l'anneau de septines, c'est probablement la propriété des septines à s'assembler en filaments qui joue un rôle important dans leur capacité à rester au cou des bourgeons.

3.7 Fonctionnement des septines

Les études fonctionnelles suggèrent que chez la levure, le rôle des septines est étroitement associé à leur assemblage en un anneau stable. Cet anneau a deux fonctions principales : il sépare le cortex du bourgeon de celui de la cellule mère et recrute les structures spécialisées au cou du bourgeon.

La première fonction aide à maintenir la polarité cellulaire et à organiser la distribution de l'actine qui assure l'acheminement des composants indispensables à la croissance du bourgeon [Pruyne *et al.*, 2000]. La deuxième fonction sert à organiser la paroi cellulaire au cou du bourgeon et à positionner la machinerie de clivage. En outre, l'anneau de septines peut également aider la cellule à contrôler sa morphologie [Barral *et al.*, 1999; Longtine *et al.*, 2000]. Dans tous les cas, la propriété primaire de l'anneau de septines est de se situer au niveau du cou du bourgeon et de s'y maintenir.

C. Field et ses collègues ont initié la caractérisation biochimique des complexes de septines. Ces études ont révélé que les septines de la levure et de la drosophile se purifient sous forme de complexes [Oegema *et al.*, 1998]. Dans le cas des septines de *S.*

cerevisiae, ce complexe contient Cdc3, Cdc10, Cdc11 et Cdc12, avec un rapport stœchiométrique d'environ 2:2:1:2. Les complexes purifiés de levure et de drosophile sont tous deux capables de former des structures filamenteuses *in vitro*. Cette polymérisation est affectée par la concentration en sel. La longueur des filaments varie de 32 nm à 100 nm dans 1 M de KCl et plus de 1500 nm dans 75 mM de KCl. À plus faible concentration de sel, les filaments ont été trouvés associés en faisceaux par interactions latérales [Frazier *et al.*, 1998]. Ces études n'avaient pas permis de déterminer si la liaison ou l'hydrolyse de nucléotides joue un rôle dans les processus de polymérisation/dépolymérisation.

L'observation que les septines peuvent former des filaments *in vitro* soutient fortement l'idée qu'elles sont les constituants des filaments de 10 nm observés *in vivo*. Cependant, les indications que la formation de filaments de septines pourrait ne pas être nécessaire pour la fonction des septines sont venues de l'analyse du mutant *cdc10*^Δ. C. Fields et ses collègues ont constaté que les cellules manquantes de Cdc10 ne forment pas de filaments au cou du bourgeon, comme observé en microscopie électronique. Les complexes de septines purifiés de ces cellules sont plus petits que ceux purifiés de cellules de type sauvage, mais ils contiennent encore Cdc3, Cdc11 et Cdc12. Ces complexes ne forment pas de filaments *in vitro* [Frazier *et al.*, 1998]. Les cellules sans Cdc10 peuvent donc avoir perdu leur capacité à former des filaments de septines. Cependant, les cellules *cdc10*^Δ sont parfaitement viables à des températures plus basses. À ces températures, les autres septines semblent se localiser correctement, puisque la septine Cdc3 se positionne correctement au cou du bourgeon. En outre, les composants connus du cou de bourgeon, Bud4, sont convenablement recrutés au cou. Aucun défaut majeur de la cytotinétique n'a été observé à ces températures. Ces résultats suggèrent que la formation de filaments de septines n'est pas requise pour la localisation des septines et leur fonction.

Jusqu'à présent, toutes les mutations de septines qui affectent la viabilité cellulaire ont en commun la perturbation de l'anneau de septines à température restrictive. La formation de l'anneau est donc une exigence majeure pour la fonction des septines. Il s'agit de comprendre comment la formation des filaments de septines et de l'anneau de septines sont couplés. D'une part, l'analyse de la présence ou de l'absence de filaments de septines dans les cellules *cdc10*^Δ n'exclut pas complètement l'élaboration

de structures de septines d'ordre supérieur. Puisque les filaments sont toujours formés en apposition étroite avec la membrane plasmique *in vivo*, il est possible que l'interaction avec les lipides joue un rôle important dans la biochimie de polymérisation des septines. En absence de Cdc10, l'exigence lipidique peut devenir plus aiguë, expliquant pourquoi les filaments ne sont pas observés *in vitro*. L'incapacité à observer des filaments de 10 nm *in vitro* peut également refléter leur fragilité plus que leur absence. D'autre part, la localisation des septines au cou du bourgeon peut, en effet, ne pas dépendre uniquement de leur polymérisation. Des interactions avec d'autres molécules pourraient assurer une bonne localisation des septines et être suffisantes pour maintenir les septines non filamenteuses à leur localisation correcte. Par exemple, il a longtemps été supposé qu'un récepteur des septines pourrait être responsable de l'association des septines avec la membrane plasmique au col du bourgeon.

La localisation des septines au cou du bourgeon tout au long du processus de bourgeonnement et leur rôle dans la mise en place d'une barrière de diffusion dans le plan de la membrane sont compatibles avec la formation des filaments de septines. Des résultats utilisant des techniques de distribution de fluorescence après photoblanchiment ou FRAP, *Fluorescence Recovery After Photobleaching*, pointent également dans cette direction [Kozubowski *et al.*, 2001; J. Dobbelaere et Y. Barral, résultats non publiés]. En accord avec la formation d'un anneau en une structure très stable, les septines ont été observées avec un *turn over* nul au cou de bourgeons de moyenne et de grande taille. La récupération de fluorescence n'a pu être observée que dans les cellules avec de très petits bourgeons et non bourgeonnantes. Ainsi, la dynamique des septines est extrêmement faible dans les cellules bourgeonnantes.

3.8 Les septines chez *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans est un nématode transparent, d'environ 1 mm de long, qui vit dans des sols tempérés. C'est un organisme multicellulaire eucaryote, mais assez simple pour être étudié en détail. La transparence de *C. elegans* facilite l'étude de la différenciation cellulaire et d'autres processus de développement chez l'organisme intact. Les souches sont peu coûteuses à reproduire et peuvent être congelées [Brenner *et al.*, 1974]. L'entretien est facile par rapport à d'autres organismes modèles multicellulaires ; quelques centaines de nématodes peuvent être conservés sur une seule plaque de gélose, ce qui est pratique pour l'analyse génétique [Avery *et al.*, 2011]

Chez *C. elegans*, il existe deux gènes codant pour les septines, UNC59 et UNC61. Les septines de *C. elegans* se concentrent au niveau du sillon de clivage, l'indentation à la surface de la cellule qui rentre en cytokinèse et qui marque l'emplacement de l'anneau d'actomyosine au site de clivage, et du corps médian, structure transitoire du fuseau, lors de la division cellulaire. Ces septines sont également impliquées dans la migration cellulaire et le guidage axonal chez cet organisme modèle [Nigon *et al.*, 1949].

Des mutations dans les gènes des septines provoquent des défauts de comportement locomoteur qui ont été attribués à des défaillances de la cytokinèse dans les neuroblastes post-embryonnaires. En effet, l'expression des septines est régulée au cours du développement, notamment dans plusieurs neurones, lorsque les axones s'étendent et que les synapses se forment. Les motoneurones chez les larves nouvellement écloses mutantes dans les gènes des septines présentent des défauts dans de multiples aspects de la migration axonale et des orientations susceptibles d'être responsables des défauts de coordination locomoteur d'où les noms *UNC* pour *uncoordinated* [Finger *et al.*, 2003].

3.9 Conclusion

Les rôles des septines les plus évidents se fondent sur les propriétés de polymérisation des septines.

Les assemblages d'ordre supérieur et en filament de septines agissent à la fois comme échafaudages pour le recrutement de protéines afin de favoriser leur interaction fonctionnelle, par exemple avant la cytokinèse. L'échafaudage de septines agit comme une barrière de diffusion qui compartimente les protéines membranaires en domaines cellulaires spécifiques entre la cellule mère et le bourgeon chez *S. cerevisiae*. Sans doute que ces fonctions ne s'excluent pas mutuellement et agissent de concert pour réguler les processus dépendants des septines.

4 Les anticorps recombinants

4.1 Généralités

La technologie des hybridomes, mise au point en 1975 par Kohler et Milstein, donnait accès pour la première fois à des anticorps monoclonaux. Ces outils révolutionnaires furent largement exploités en laboratoire durant les années qui

suivirent, alors que leur utilisation *in vivo* restait très limitée. De nos jours, les anticorps, omniprésents dans les domaines de la recherche et du diagnostic, ont progressivement envahi le monde de la thérapie.

La difficulté d'obtenir des anticorps monoclonaux humains a stimulé le développement de l'ingénierie génétique des anticorps. Comme la plupart des anticorps monoclonaux sont produits dans des cellules de souris, on peut observer une réaction immunitaire lors de leur injection chez un patient. Cette immunité anti-souris inactive progressivement l'action bénéfique de l'anticorps monoclonal. Pour remédier à ce problème, on produit des anticorps « chimériques » par fusion des gènes codant les régions variables d'un anticorps murin et les régions constantes d'une immunoglobuline humaine. L'alternative est de produire des anticorps « humanisés » en substituant les CDRs, *Complementarity Determining Regions*, régions hypervariables, d'une immunoglobuline humaine par ceux de l'anticorps monoclonal de souris. Les anticorps humanisés contiennent donc uniquement la petite partie variable murine composée des régions hypervariables qui sont en contact étroit avec l'antigène. (Figure 11) [Magniez, 2008].

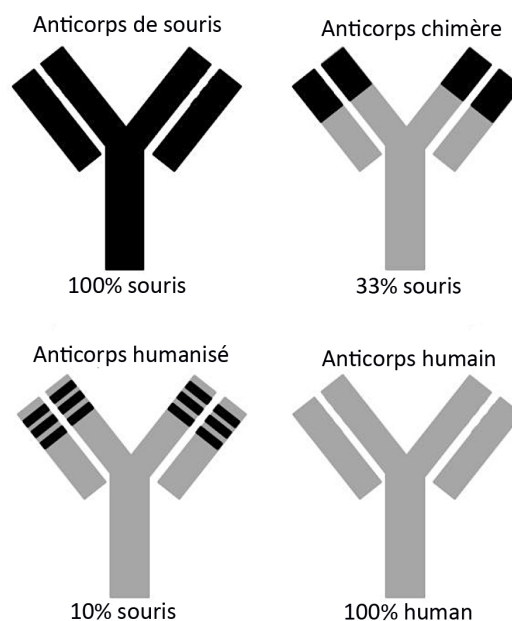


Figure 11 : Nomenclature et nature des régions composant les anticorps monoclonaux. Initialement totalement d'origine murine, les anticorps se sont progressivement humanisés de manière à diminuer leur immunogénicité et à améliorer leur propriétés pharmacologiques. D'après Goubet *et al.*, 2018.

L'avènement des techniques de biologie moléculaire a permis l'amplification des régions d'ADN codant les anticorps, rendant possible la synthèse de fragments d'anticorps recombinants. Les immunoglobulines entières sont le format thérapeutique le plus usuel car il permet d'interagir avec l'antigène et d'activer différentes fonctions effectrices, tout en possédant une longue demi-vie. Cependant, les fragments de petites tailles sont privilégiés car ils présentent l'avantage de pouvoir être produit efficacement par les cellules bactériennes [Jeong *et al.*, 2011; Miethe *et al.*, 2012], d'avoir une immunogénicité réduite et une diffusion accrue au sein des tissus.

Une étape décisive dans l'ingénierie des anticorps a été franchie par l'établissement de banques combinatoires de séquences cDNA des parties variables des chaînes lourdes et légères isolées à partir de lymphocytes ou de splénocytes murins ou humains. Ces gènes peuvent-être clonés par combinaison aléatoire des chaînes lourdes et légères dans des vecteurs de phages filamenteux (M13 ou fd) de façon à exprimer les anticorps sous forme Fv ou scFv à la surface des phages (Figure 12).

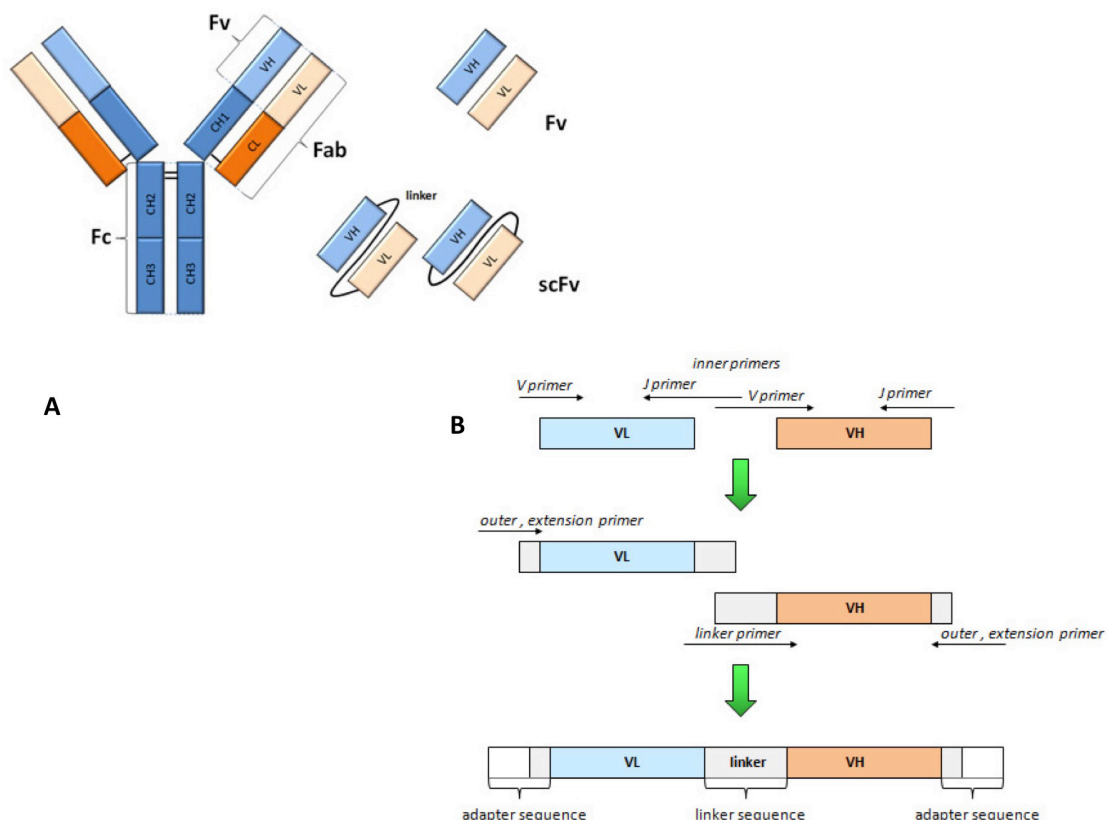


Figure 12 : Anticorps recombinants.

(A) Représentation schématique d'un fragment scFv et d'un fragment Fv.

(B) Principe de l'assemblage de fragments scFv par PCR. Entre 4 et 7 *primers*, amorces, seront nécessaires pour assembler un scFv complet. D'après Andris-Widhopf *et al.*, 2011.

4.2 Les banques combinatoires d'anticorps

Les gènes réarrangés des anticorps peuvent être amplifiés séparément par PCR, *polymerase chain reaction*, associés au hasard puis clonés dans des phages permettant d'obtenir ainsi des banques combinatoires en *phage display*, présentation à la surface des bactériophages [Lefranc et al., 1999].

Il existe 2 types de banques combinatoires en fonction de la source des anticorps. Dans le cas de banques construites à partir d'une source « immunisée », des fragments d'anticorps de forte affinité pour l'immunogène peuvent être sélectionnés directement car les réarrangements et les optimisations moléculaires envers la cible antigénique ont été opérés dans les cellules lymphocytaire B (Figure 13).

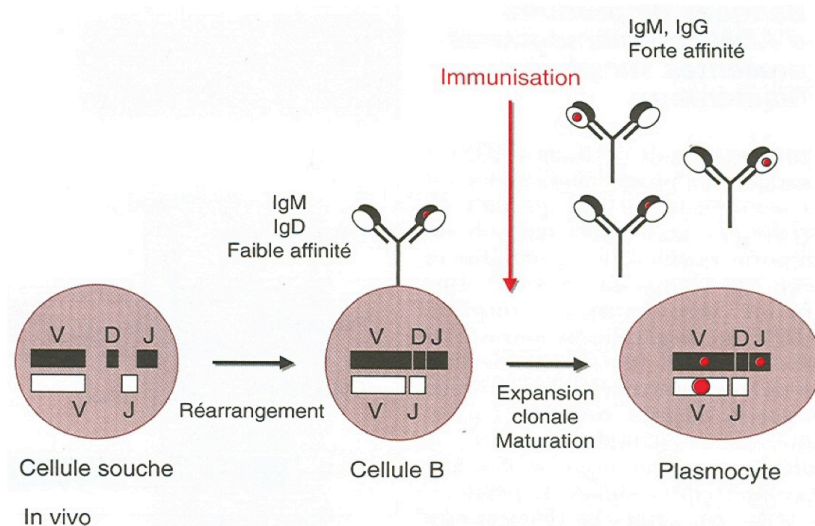


Figure 13 : Production d'anticorps *in vivo*.

In vivo, après réarrangement des différents gènes variables dans les cellules B, les anticorps naïfs sont exprimés en surface sous forme d'IgM et d'IgD. Après immunisation, les clones qui reconnaissent l'immunogène prolifèrent (expansion clonale) et se différencient en plasmocytes qui sécrètent les anticorps sous forme d'IgG (commutation de classe). Des mutations somatiques (représentées dans le schéma par des points rouges), s'accumulent dans les régions variables et conduisent, après sélection, à une augmentation de l'affinité des anticorps pour l'immunogène. Les banques combinatoires permettent de mimer ce processus *in vitro*. D'après Lefranc *et al.*, 1999.

Dans le cas de banques construites à partir d'un répertoire naïf, les anticorps sont d'affinité modérée mais peuvent être sélectionnés contre une grande variété d'antigènes sans recourir à l'immunisation [Griffiths *et al.*, 1993].

Les banques combinatoires naïves dites naturelles sont construites à partir des gènes réarrangés de l'animal ou de l'homme (Figure 14).

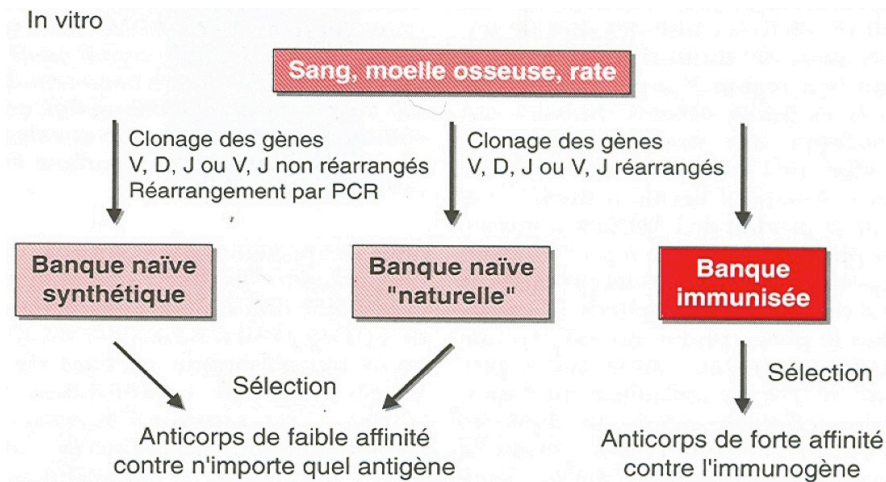


Figure 14 : Production *in vitro* de banques combinatoires d'anticorps mimant le processus d'accumulation des mutations somatiques dans les régions variables et conduisant, après sélection, à une augmentation de l'affinité des anticorps pour l'immunogène. D'après Lefranc *et al.*, 1999.

Les banques combinatoires naïves peuvent être synthétiques, et sont construites à partir de différents gènes non réarrangés. Leur réarrangement est réalisé *in vitro* par PCR. L'utilisation d'oligonucléotides aléatoires correspondant aux régions CDR, *complementarity determining regions*, [Hoogenboom *et al.*, 1992] permet d'augmenter la diversité de la banque. Plus la banque combinatoire naïve est complexe, plus il est possible d'isoler des anticorps contre n'importe quel antigène et plus leur affinité est élevée (Figure 14). Cette technologie combinatoire a permis d'obtenir des banques naïves de plus de 10^{10} fragments Fab différents présentant de bonnes affinités avec des constantes d'affinité de 10^8 mol.L^{-1} à 10^9 mol.L^{-1} pour une très grande variété d'antigènes [Griffiths *et al.*, 1994].

Pour obtenir les « meilleurs » anticorps en terme de spécificité et d'affinité, les permutations de chaînes qui ont lieu durant le développement des cellules B peuvent être mimées *in vitro* par la technique de l'échange de chaînes, *chain shuffling*, dans laquelle les gènes d'une chaîne VH ou VL sont amplifiés puis réassociés à tous les gènes de l'autre chaîne de la banque [Winter *et al.*, 1994]. La maturation de l'affinité est également assurée par introduction de mutations dans les CDR des fragments sélectionnés.

Le système artificiel des banques combinatoires est donc particulièrement intéressant pour toute production d'anticorps pour laquelle l'immunisation est difficile voire impossible [Barbas *et al.*, 1993].

4.3 Le *phage display* – présentation sur phage

Le *phage display*, exposition à la surface du bactériophage, a été décrit pour la première fois en 1985 par Smith [Smith *et al.*, 1985]. Son équipe a mis au point l'affichage de peptides à la surface d'un phage filamenteux grâce à la fusion de la séquence codante du peptide d'intérêt avec le gène III ou VIII du phage qui codent respectivement les protéines de capsid mineure et majeure. L'hybride d'ADN constitué par le gène du phage et le gène d'intérêt est inséré dans *E. coli*, de façon que le phage modifié soit produit par la bactérie.

Le gène codant le fragment d'anticorps peut être exprimé de deux façons différentes. Il peut être directement inséré dans le génome phagique et sera donc exprimé autant de fois qu'il y a de copies de la glycoprotéine à laquelle la protéine correspondante est fusionnée, cinq fois pour la PIII par exemple [O'Connell *et al.*, 2002]. Cependant l'expression de plusieurs fragments à la surface des phages cause des phénomènes d'avidité non souhaités. Pour remédier à ce problème, le gène de la protéine de fusion peut être apporté par un plasmide ou un phagemide [Paschke *et al.*, 2009 ; Qi *et al.*, 2012]. Les phagemides sont des vecteurs de clonage hybrides, monocaténares, dérivant des phages filamenteux et des plasmides, et comportent deux origines de réplication. Les phagemides comportent aussi un promoteur faible, une séquence ADN signal d'encapsulation du vecteur ainsi qu'un gène de résistance à un antibiotique.

Dès l'entrée du phagemide dans le cytoplasme bactérien, l'origine de réplication plasmidique, comme colE1, permet de convertir le phagemide monocaténaire, infectieux, en phagemide double brin, qui est la forme de réplication dans la bactérie. Après infection avec les phages assistants, l'origine de réplication phagique permet au phagemide d'être dupliqué sous forme monocaténaire, qui est destinée à être empaquetée sous forme de phages infectieux.

Si le phage auxiliaire code aussi pour des protéines PIII non recombinantes, une partie des PIII sera native et l'autre, codée par le phagemide, sera fusionnée à un

fragment d'anticorps. Selon les niveaux d'expression respectifs de la protéine PIII native et de la protéine PIII fusionnée, les phages comporteront théoriquement de zéro à cinq protéines de fusion. Généralement l'expression de la PIII native est supérieure à celui de la PIII fusionnée, et statistiquement les phages n'exprimeront aucune ou une seule PIII fusionnée à leur surface [Stefan *et al.*, 2007] .

Il est aussi possible d'utiliser des vecteurs possédant des promoteurs inductibles qui permettent d'exprimer un nombre plus ou moins important de PIII de fusion à la surface des phages.

Les phages recombinants sont ensuite sélectionnés pour leur capacité de liaison à la cible, la protéine ou le peptide d'intérêt.

Cette technologie a par la suite été perfectionnée par Wells [Mc Cafferty *et al.*, 1990] et Winter [Lowman *et al.*, 1991] qui ont démontré la possibilité d'exprimer à la surface des phages, après transfection de *E. coli* avec l'hybride d'ADN en combinaison avec un phage *helper* fournissant la machinerie nécessaire à la réplication du phagemide, des protéines fonctionnelles telles que des anticorps à usage thérapeutique car leurs structures et conformations fonctionnelles peuvent être préservées.

Les bactériophages les plus souvent utilisés pour le *phage display* sont le bactériophage M13 et le phage filamenteux fd bien que les phages T4, T7 et λ aient aussi été utilisés (Figure 15).

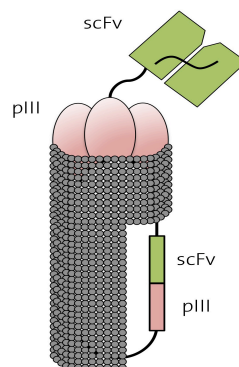


Figure 15 : Phage présentant un fragment anticorps scFv, en tant que protéine de fusion d'une protéine d'enveloppe mineure pIII. D'après Lovato, 2009.

Le processus de sélection des clones spécifiques se compose de plusieurs cycles, comportant chacun des étapes de capture, de lavage, d'élution et d'amplification conduisant à l'enrichissement d'une suspension de phages en clones spécifiques qui

seront ensuite testés par criblage *in vitro* de façon à sélectionner les phages les plus affins pour l'antigène d'intérêt.

Dans le cas d'un criblage contre un antigène adsorbé sur un support plastique, comme des immunotubes ou des plaques ELISA, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, une étape de saturation est nécessaire afin d'empêcher l'établissement d'interactions entre les fragments d'anticorps et le support.

La banque de phages est ensuite incubée avec l'antigène d'intérêt, afin de permettre l'interaction entre les fragments d'anticorps exprimés à la surface des phages et l'antigène. Après incubation, des étapes successives de lavage sont réalisées avec un tampon dont la stringence permet de rompre les liaisons non spécifiques qui auraient pu être établies malgré l'étape de saturation préalable. Parmi les détergents utilisés, le polysorbate 20, Tween 20, est le plus utilisé car il présente l'avantage d'être non toxique pour les phages et les bactéries aux concentrations utilisées.

Classiquement, le nombre de lavages est augmenté à chaque tour de criblage pour éliminer progressivement les phages peu ou pas réactifs. En effet, dans le cas où la stringence serait importante dès le premier tour de criblage, des phages exprimant des fragments d'anticorps très affins mais présents en faible nombre pourraient être éliminés [Chahboun *et al.*, 2011].

Après lavages, les phages ayant interagi avec l'antigène sont élués en augmentant la force ionique, en diminuant le pH ou encore par trypsination. Les phages élués sont ensuite amplifiés par l'infection d'une culture d'*E. coli* contenant les phages assistants. Lors de la phase de culture, la sélection des cellules bactériennes infectées à la fois par un phagemide et un phage assistant est réalisée par l'ajout de trois d'antibiotiques dans le milieu. Un premier antibiotique, spécifique du gène de résistance porté par l'ADN bactérien, est ajouté afin d'éviter toute contamination par d'autres bactéries. Un deuxième antibiotique, spécifique du gène de résistance porté par l'ADN phagemidique, est ajouté pour sélectionner les bactéries infectées par les phagemides élués. Finalement un troisième antibiotique, spécifique du gène de résistance porté par l'ADN phagique, est ajouté pour sélectionner les bactéries qui sont infectées par le phage assistant.

Après incubation du mélange associant les bactéries, les phages élués et les

phages assistants, les phages d'intérêt produits peuvent être récupérés par précipitation avec du PEG800 puis par centrifugation [Barbas *et al.*, 2001]. Ces phages peuvent être à nouveau criblés contre la protéine cible afin d'enrichir progressivement la population phagique avec les clones les plus affins. Généralement, trois à cinq tours de criblage sont réalisés. Il a été observé qu'à chaque tour de criblage, la proportion de phages exposant un fragment d'anticorps spécifique de l'antigène augmente d'un facteur 1 000 [Marks *et al.*, 1992]. Après les étapes de sélection, la réactivité des phages élués est évaluée par ELISA.

Pour produire les fragments d'anticorps solubles, les vecteurs phagemidiques utilisés peuvent contenir un codon stop de type ambre (TAG) entre le gène codant la protéine phagique (PIII) et le gène codant le fragment d'anticorps. Dans les souches bactériennes suppressives, utilisées pour l'amplification des phages pendant le criblage, ce codon ambre est lu comme un acide glutamique ce qui ne stoppe pas la traduction, permettant la fusion du fragment d'anticorps et de la protéine phagique. Pour produire le fragment d'anticorps soluble, le vecteur est transformé dans une souche bactérienne non-suppressive qui lit le codon ambre comme un codon stop, ce qui arrête la traduction et permet donc d'exprimer uniquement le fragment d'anticorps [Barderas *et al.*, 2006; Griffiths *et al.*, 1994]. Dans le cas où le vecteur ne possède pas de codon ambre entre le fragment d'anticorps et la protéine phagique, il est nécessaire d'exciser l'ADN codant le fragment d'anticorps, puis de le cloner dans un vecteur d'expression.

La production des fragments d'anticorps est généralement réalisée dans l'espace périplasmique d'*E. coli*, où les conditions d'oxydoréduction permettent la formation des ponts disulfures nécessaires à la conformation des fragments d'anticorps comme les Fab ou des scFv [Better *et al.*, 1988; Skerra *et al.*, 1988]. La présence d'un peptide signal en amont du gène codant le fragment d'anticorps, est nécessaire pour permettre l'exportation dans le périplasme [Lei *et al.*, 1987]. La présence d'une séquence spécifique d'étiquetage comme une région hexa-histidine, le polypeptide Myc dérivé du gène c-Myc ou encore un peptide FLAG(R) est aussi nécessaire pour permettre une purification des fragments d'anticorps par affinité.

Des pressions de sélection différentes ainsi qu'une diversité additionnelle par mutagenèse du gène d'intérêt peuvent être introduites à chaque cycle. Les phages

sélectionnés sont ensuite testés individuellement pour l'activité ou la fonction recherchée (Figure 16).

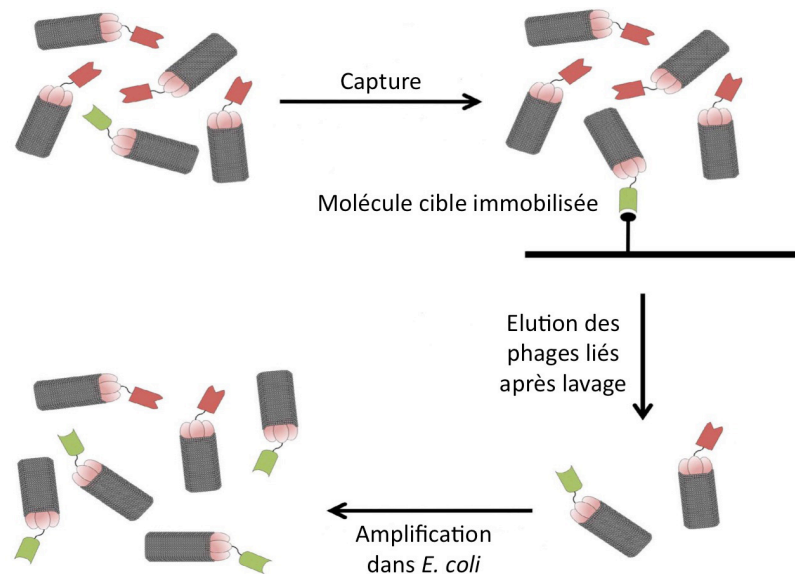


Figure 16 : Sélection de la spécificité de liaison dans une bibliothèque de présentation sur phages.

Une banque de protéines affichées sur la surface du phage est utilisée comme entrée pour la sélection. Les phage affichant les protéines de liaison sont capturés sur des molécules cibles immobilisées et, après lavage, les phages liés peuvent être élués. Cette population de phages est ensuite propagée dans des cultures bactériennes après infection de cellules d'*E. coli* et peut être utilisé pour d'autres cycles de sélection. D'après Lovato, 2009.

Les domaines variables d'un anticorps peuvent être exprimés à la surface du phage, soit sous forme de fragments scFv, *single-chain fragment variable*, dans lesquels les domaines VH et VL sont liés de manière covalente par un court peptide, soit sous forme de fragments Fab, *antigen-binding fragment* (Figure 17) [Winter *et al.*, 1994; Barbas *et al.*, 1993]. Cette technique est particulièrement intéressante dans le cas d'anticorps humains pour lesquels les hybridomes sont techniquement et éthiquement difficiles à obtenir.

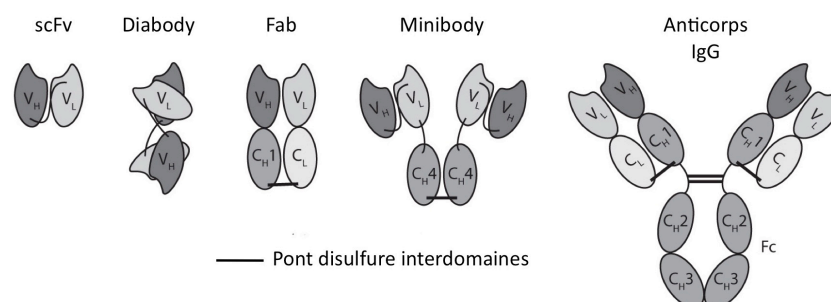


Figure 17 : Différents formats d'anticorps et de fragments d'anticorps. D'après Lovato, 2009.

Cette stratégie fondée sur la sélection est nettement plus puissante qu'une stratégie de criblage classique qui nécessite de nombreuses manipulations et qui ne peut pas être appliquée à des banques de taille supérieure à 10^6 clones indépendants. La méthode de *phage display* permet de cribler jusqu'à 10^{10} phages recombinants différents dans un volume très réduit de quelques microlitres et l'on peut sélectionner un phage dont la fréquence n'est que de $1/10^8$ dans la banque originale [Sergeeva *et al.*, 2006].

L'association de la protéine exposée en surface, phénotype, avec son ADN codé par le phage, génotype, permet d'accéder rapidement aux séquences des protéines sélectionnées, car l'ADN est directement isolé avec la protéine pour laquelle il code [Souriau *et al.*, 1998]. De plus, les phagemides peuvent servir de vecteur d'expression, chez *E. coli* par exemple, afin de produire la protéine d'intérêt une fois celle-ci sélectionnée [Heyd *et al.*, 2003].

En outre, la taille restreinte du génome du bactériophage simplifie les étapes de clonage [Burritt *et al.*, 1996]. Les avantages sont aussi que la grande stabilité des particules phagiques permet un stockage facile à 4 °C, ou directement dans les bactéries à -80°C. la machinerie d'infection phagique étant très efficace, on obtient facilement d'importantes quantités de matériel compatibles avec le criblage de banques de grandes tailles qui peuvent être régulièrement régénérées [Souriau *et al.*, 1998] et ainsi éviter leur épuisement.

Cependant, à cause du caractère « vivant » de ces banques [Souriau *et al.*, 1998], des clones toxiques ou possédant un caractère qui diminuerait l'infectuosité des phages, leur sécrétion, ou encore la croissance des bactéries seront contre sélectionnés et disparaîtront de la banque, indépendamment du processus de sélection. De plus, le taux d'expression de certaines séquences peptidiques dans *E. coli* peut être variable, par exemple en fonction de la fréquence d'utilisation des codons, ce qui peut aussi constituer un biais dans la sélection [Rodi *et al.*, 2002]. Enfin, les amplifications successives de la banque peuvent appauvrir sa diversité car certains clones présentant des avantages de croissance vont augmenter considérablement au sein de la population au détriment d'autres clones, ce qui, là encore, contribue à biaiser la sélection. Dans certains cas, il a été montré que des protéines de plus faible affinité pouvaient être isolées plus efficacement lors des étapes de sélection [Malone *et al.*, 1996]. Les facteurs responsables ne sont pas totalement compris mais pourraient être liés à la séquence même des

protéines ou peptides présentés qui influencerait l'efficacité de leur expression et/ou serait potentiellement toxique pour *E. coli*. Ainsi, la sélection deviendrait aussi dépendante de la production, par certains clones bactériens, d'un phage-peptide moins toxique et/ou d'expression favorisée, et non plus seulement à une affinité optimisée du phage-peptide pour la cible [Schier *et al.*, 1996]. De plus, certains motifs peptidiques, notamment ceux riches en résidus hydrophobes, sont susceptibles d'interagir non spécifiquement avec toute molécule ou surface présente dans le dispositif expérimental de sélection comme par exemple le plastique de la phase solide [Adey *et al.*, 1995]. Enfin, il peut arriver que les peptides synthétisés en tant que composés solubles présentent une activité différente que lorsqu'ils sont présentés à la surface du phage [Falciani *et al.*, 2005].

4.4 ETH-2 - banque d'anticorps humain en *phage display*

ETH-2 est une banque d'anticorps humains synthétiques au format scFv, *single chain Fragment variable*, fusionnés à la partie N-terminale de la protéine pIII de la capsid du bactériophage. Le format d'anticorps scFv a été choisi en raison d'une expression et d'une stabilité supérieures à la protéolyse, à une liaison à l'antigène améliorée et à une immunogénicité réduite par rapport aux fragments Fab.

La banque ETH-2, clonée dans des vecteurs phagemides pDN332 dérivé de pHEN1 [Hoogenboom *et al.*, 1997], qui codent pour des protéines de fusion scFv-pIII par un polypeptide flexible (Gly4Ser)₃, est basée sur un seul segment VH (DP47) et un seul segment Vk (DPK22) (Figure 16) [Viti *et al.*, 2000]. L'utilisation du segment de la lignée germinale DP47 VH offre un certain nombre d'avantages, allant d'une stabilité thermodynamique plus élevée [Ewert *et al.*, 2003] à la possibilité d'utiliser la protéine A pour la purification et la détection des anticorps [Hoogenboom *et al.*, 1992]. La variabilité a été limitée au VL CDR3 (positions 91, 92, 93, 94 et 96 pour Vk) et à quatre à six résidus dans le VH CDR3 (positions 95 à 100), à cause de leur rôle en tant que contacts antigéniques communs et de la grande variabilité des anticorps naturels dans ces régions [Padlan *et al.*, 1994].

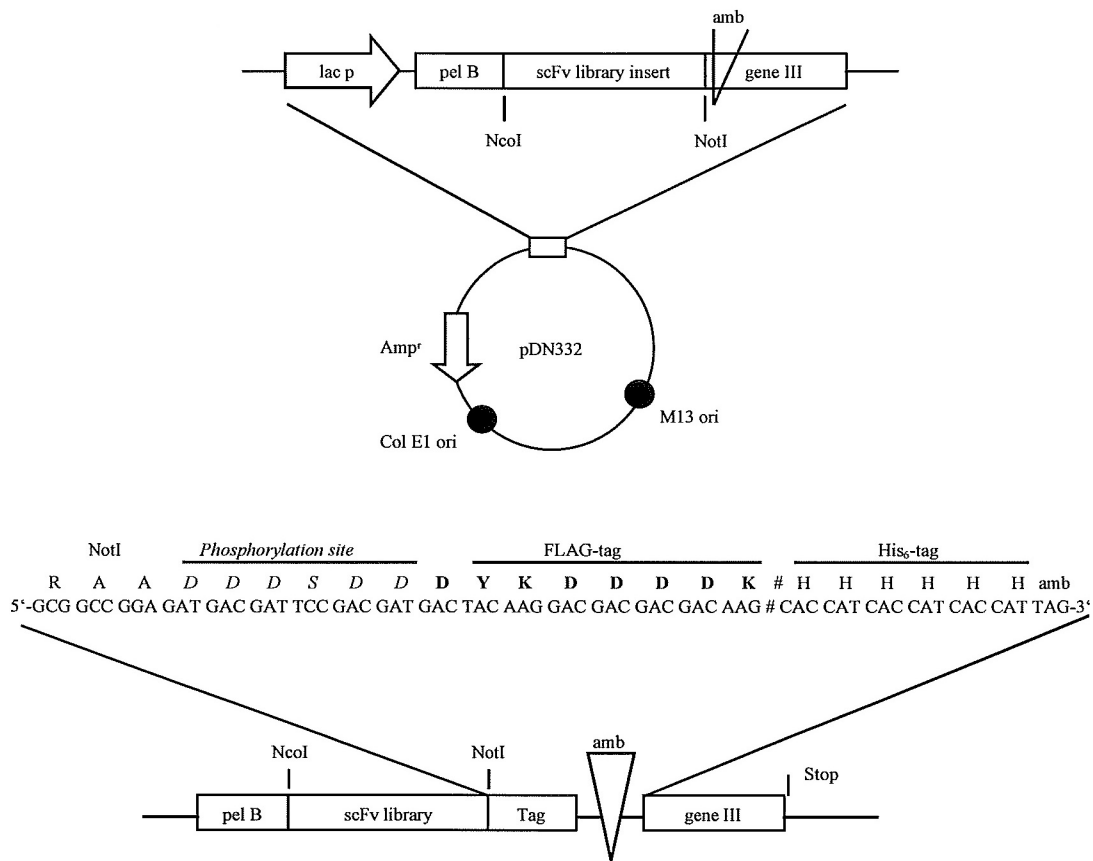


Figure 18 : Représentation schématique de la banque d'anticorps humain recombinant ETH-2. (A) La banque d'anticorps est clonée dans le phagemide pDN332, (B) La banque est étiquetée FLAG et 6xHis. D'après Viti *et al.*, 2000.

La puissance de la banque ETH2, gracieusement mise à notre disposition par le professeur Dario Neri (institut IPW, ETH Zurich), montre ses limites car bien qu'il ait été montré que des anticorps de haute affinité peuvent être obtenus avec des CDR3 courts dans la chaîne lourde [Lavoie *et al.*, 1992], le choix de CDR3 court limite la diversité potentielle de la banque et réduit la variabilité de clone à clone.

4.5 Les *Intrabodies* - anticorps intracellulaires

Les *intrabodies* représentent non seulement une nouvelle voie pour la recherche fondamentale en permettant l'étude de la dynamique de protéines endogènes, mais aussi des perspectives intéressantes pour la recherche appliquée en terme d'immunisation intracellulaire en vue d'une utilisation thérapeutique.

Contrairement aux anticorps naturellement exprimés qui sont sécrétés et dirigés vers des cibles extracellulaires, les *intrabodies* exprimés intracellulairement, sont dirigés vers des cibles à l'intérieur de la cellule. Ce qui permet d'utiliser la très haute

spécificité de liaison anticorps/antigène pour l'analyse fonctionnelle des protéines dans les cellules vivantes [Marschall *et al.*, 2016].

Les premiers essais des anticorps dans les cellules vivantes ont été effectués dans les années 1980, par micro-injections d'IgG dans le cytoplasme. Ils ont permis de démontrer que ces anticorps pouvaient interférer avec la fonction de leur antigène intracellulaire [Bloese *et al.*, 1984]. Cependant, la micro-injection ne permet la manipulation que d'un petit nombre de cellules à la fois ce qui limite grandement les applications de cette technique. Par conséquent, un certain nombre d'approches mises en oeuvre ont été essayés pour introduire les anticorps dans les cellules vivantes [Marschall *et al.*, 2016]. Dans toutes ces méthodes, en plus de la faible efficacité de livraison des anticorps dans le cytoplasme, les anticorps étaient rapidement dirigés vers les machineries de dégradation intracellulaire. Parce que l'inhibition de la fonction antigénique par la liaison des anticorps à leur l'antigène nécessite généralement un rapport molaire au moins égal à 1:1, la faible efficacité de ces méthodes ont considérablement limité leurs applications pour l'interférence fonctionnelle intracellulaire [Marschall *et al.*, 2014].

Face à ces difficultés, les tentatives d'électroporation de grandes populations de cellules ont néanmoins démontré que les anticorps scFv-Fc sont fonctionnels dans les cellules pendant au moins 96 heures après l'électroporation [Desplancq *et al.*, 2016; Freund *et al.*, 2013; Marschall *et al.*, 2014]. La meilleure façon d'introduire des anticorps dans le cytoplasme a été d'exprimer directement l'anticorps dans la cellule [Valle *et al.*, 1982].

Il a été observé que l'approche de *l'intrabody* fonctionne le mieux avec les fragments de liaison à l'antigène d'une l'IgG, les fragments Fv à chaîne unique (Figure 19) qui ne nécessitent pas l'assemblage de deux chaînes de protéines comme l'anticorps d'origine, éliminant le besoin de vecteurs bicistroniques et les problèmes associés pour l'obtention du bon rapport chaîne lourde/légère durant l'expression intracellulaire. Cependant, l'expression cytosolique des *intrabodies* ne donne pas toujours des anticorps fonctionnels, car ils ont tendance à ne pas se structurer correctement dans le cytosol qui est milieu réducteur empêchant la formation de liaisons disulfures [Biocca *et al.*, 1995; Stocks *et al.*, 2005] et d'où sont absentes les protéines chaperonnes du réticulum endoplasmique, RE.

Les *intrabodies* vont différer selon leurs compartiments intracellulaires cibles. Les *intrabodies* peuvent alors être classés en deux catégories en fonction de leurs exigences structurales pour être fonctionnels, c'est à dire la neutralisation de la fonction cible [Cardinale *et al.*, 2015]. Certains *intrabodies* doivent se replier dans des conditions réductrices et d'autres peuvent former des liaisons disulfures dans l'environnement dans lequel ils sont exprimés. Alors que les anticorps qui sont traduits dans le cytosol doivent se replier dans des conditions réductrices, les anticorps peuvent former des liaisons disulfures dans le RE et également dans les mitochondries [Biocca *et al.*, 1995]

Les *intrabodies* cytosoliques peuvent être utilisés pour cibler les protéines du cytosol ainsi que les protéines nucléaires si une séquence de localisation nucléaire est fusionnée à *l'intrabody*. En revanche, les *intrabodies* dirigés vers le RE ne peuvent cibler que les protéines sécrétées. Cependant, parce que de nombreux processus cellulaires sont contrôlés par la signalisation via des récepteurs membranaires ou des facteurs sécrétés, les *intrabodies* permettent de cibler les protéines membranaires et les protéines sécrétées fournissant ainsi la clé de compréhension de nombreux processus cellulaires cruciaux. Par exemple une nouvelle approche dans l'utilisation des *intrabodies* a été de coupler à *l'intrabody* une séquence signal « KDEL » de localisation dans le RE. De cette manière, *l'intrabody* piègera sa protéine membranaire ou normalement sécrétée cible dans le RE. Ces cibles ne pourront alors pas exercer leurs fonctions car incapables d'atteindre leurs sites d'action (Figure 17) [Marschall *et al.*, 2015].

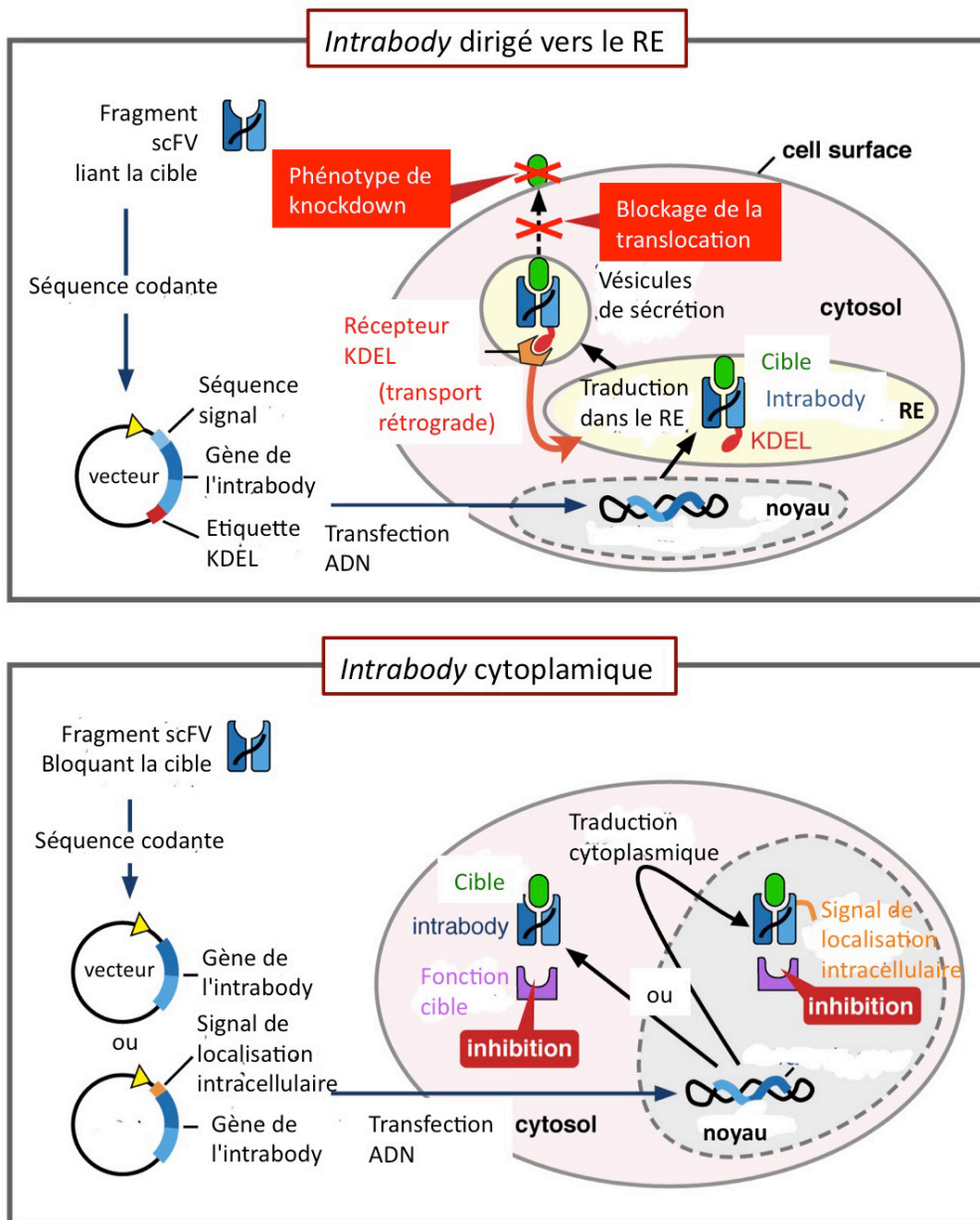


Figure 19: Propriétés et modes d'action d'intrabodies ciblant des antigènes dans le RE (en haut) ou dans le cytoplasme (en bas).

Les *intrabodies* ciblés au RE nécessitent une séquence de signal les guidant dans le RE. Ils provoquent alors un *knockdown* fonctionnel en se liant à leur protéine cible (antigène) à l'intérieur du RE et en y restant, empêchant ainsi celle-ci d'atteindre la surface cellulaire ou d'être sécrétée. Pour obtenir la rétention d'une protéine cible dans l'RE, il faut que l'*intrabody* lui-même soit retenu dans le RE, ce qui est obtenu en ajoutant le signal de rétention dans le RE "KDEL" à l'*intrabody*. La liaison spécifique d'un *intrabody* à sa cible dans le RE est généralement suffisante pour produire le *knockdown*, tandis que les *intrabodies* cytoplasmique doivent généralement être en plus inhibiteurs ou bloquants. Une seconde différence par rapport aux *intrabodies* du RE est que les *intrabodies* cytoplasmiques sont exprimés dans le cytoplasme, où les conditions de repliement des anticorps sont moins favorables que dans le RE. Les *intrabodies* cytoplasmique peuvent également être ciblés vers le noyau s'ils disposent d'une séquence de localisation nucléaire. D'après Andrea *et al.*, 2016.

Parce que la majorité des *intrabodies* ne se structurent pas correctement dans le cytosol, plusieurs stratégies ont été proposées pour sélectionner les *intrabodies* stables et fonctionnels dans le cytosol [Marschall *et al.*, 2015]. Ces stratégies incluent l'utilisation de protéines chaperonnes sur lesquelles sont greffées les éléments de liaison à l'antigène [Donini *et al.*, 2003], l'utilisation d'anticorps à domaine unique, tels que des nanobodies [Kaiser *et al.*, 2014]. Les *intrabodies* ont également été fusionnés à d'autres protéines dans le but d'augmenter leur solubilité cytoplasmique [Philibert *et al.*, 2007; Visintin *et al.*, 2002 ; Shaki-Loewenstein *et al.*, 2005]. D'autres formats que les scFv ont aussi été utilisés avec succès : les Fab, les anticorps divalents ou bispécifiques (*diabodies*), les *single domain* VL ou VH et les *single domain* VHH [Holliger *et al.*, 2005]. Les formats simples VL, simple VH ou VHH ont l'avantage d'être généralement solubles et stables en milieu réducteur car, étant des monomères, ils n'ont pas de ponts disulfures inter-chaînes. Il a de plus été montré que le manque de ponts disulfures intra-chaîne n'est pas préjudiciable à la fonctionnalité du VH ou VL [Tanaka *et al.*, 2008]. Comme dans le cas des scFv, les régions charpentes des VHH peuvent être optimisées pour mieux résister à la réduction [Saerens *et al.*, 2005]. Cependant, la solubilité seule ne garantit pas la fonctionnalité. Il est aussi possible d'effectuer la sélection de l'*intrabody* directement en milieu réducteur, par exemple en effectuant le criblage en système double-hybride de levure.

Les étapes permettant le développement d'un *intrabody* doivent donc tenir compte de l'origine, naturelle ou synthétique, de l'anticorps, de ses caractéristiques de liaison à son antigène, de sa résistance aux conditions intracellulaires et de l'application souhaitée (Figure 20). Seuls les anticorps détectant la forme native de leur cible sont éligibles pour cette approche.

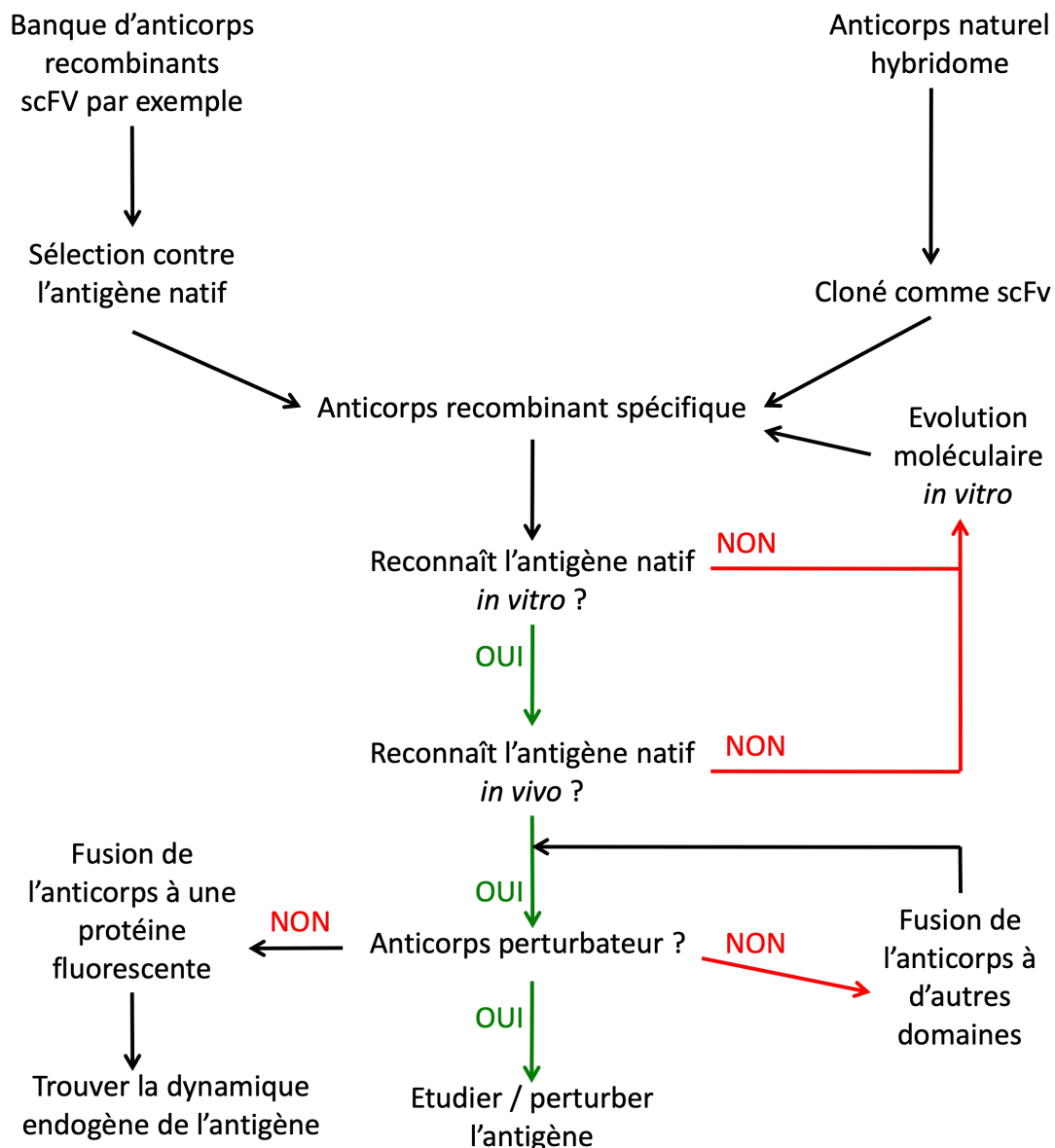


Figure 20 : Les différentes stratégies de développement d'un *intrabody*.

Le diagramme schématise les origines, tests, décisions et solutions mises en en jeu dans le développement d'*intrabodies* selon que l'application finale est le blocage de l'antigène ciblé ou son traçage *in cellulo*.

Les *intrabodies* dont l'expression perturbe les protéines ciblées représentent bien sûr un outil de choix pour la recherche fondamentale. Cependant, tous les *intrabodies* ne sont pas bloquants et ils peuvent aussi se lier à une protéine sans en gêner sa fonction. Ces anticorps peuvent être manipulés, notamment en étant fusionnés à d'autres protéines ou à des signaux particuliers et ainsi devenir des perturbateurs spécifiques. Par ailleurs, les *intrabodies* non bloquants peuvent représenter des outils

uniques pour suivre la dynamique des protéines endogènes sans que l'on ait recours à la surexpression de protéines sauvages ou mutées.

4.6 Conclusion

Dans le cadre de l'utilisation d'un anticorps pour ses capacités de liaison spécifique à un antigène, on peut le restreindre à ses fragments variables de liaison à l'antigène les plus facilement manipulable.

Il est possible d'introduire de l'ADN codant des fragments d'anticorps dans des phages qui exprimeront alors ces fragments à leur surface. Les phages peuvent ainsi être utilisés comme des outils permettant d'associer un génotype (ADN codant le fragment d'anticorps) à un phénotype (fragment d'anticorps exprimé à leur surface). L'interaction des phages avec l'antigène permet de sélectionner les fragments d'anticorps interagissant avec l'antigène intérêt.

Bien que des techniques alternatives aient été développées, la technique de référence reste l'exposition de fragments d'anticorps à la surface des phages (*phage display*) car elle permet en particulier d'utiliser *E. coli* pour la production des particules phagiques et pour l'expression des fragments d'anticorps sélectionnés.

Différentes techniques ont été développées afin de créer des banques de fragments d'anticorps exprimés à la surface des phages. A l'aide de ces techniques, les fragments d'anticorps les plus affins contenus dans ces banques peuvent être isolés, même si ceux-ci sont présents en très faible nombre.

Deux grandes catégories de banques existent : les banques naïves et les banques immunes. Toutes deux sont constituées d'un grand nombre de fragments d'anticorps formés par l'association aléatoire, dit combinatoire, des domaines variables des chaînes lourdes et des domaines variables des chaînes légères des immunoglobulines.

Il est possible d'adapter la technique d'exposition de fragments d'anticorps à la surface des phages pour ne sélectionner que des anticorps d'intérêt actif dans le milieu intracellulaire [Poul *et al.*, 2000; Poul *et al.*, 2009].

Le format scFv, *fragments variables simple chaîne*, est le plus couramment utilisé pour les *intrabodies*. Il est constitué uniquement des domaines variables des chaînes lourdes et légères (L) VH et VL des anticorps, reliés entre eux par un lien peptidique flexible, généralement quinze acides aminés, [Avril, 2013]. En sous-clonant ces

fragments d'anticorps dans des vecteurs pour permettre une expression intracellulaire, il est possible d'inactiver certaines protéines, le fragment d'anticorps recombinant se fixant directement à un domaine fonctionnel de ces dernières, perturbant l'interaction avec un partenaire ou encore retenant la protéine dans un compartiment cellulaire particulier. Seuls les anticorps détectant la forme native de leur cible sont éligibles pour cette approche, mais ce n'est pas la seule limitation des *intrabodies*.

Les *intrabodies* dont l'expression perturbe les protéines ciblées représentent bien un outil de choix pour la recherche fondamentale. Cependant, tous les *intrabodies* ne sont pas bloquants et ils peuvent aussi se lier à une protéine sans en gêner sa fonction. Ces anticorps peuvent cependant être manipulés, notamment en étant fusionnés à d'autres protéines ou à des signaux particuliers et ainsi devenir des perturbateurs spécifiques. Les *intrabodies* non bloquants peuvent représenter des outils uniques pour suivre la dynamique des protéines endogènes sans que l'on ait recours à la surexpression de protéines sauvages ou mutées.

1 Résultats publiés

Organisation structurale du complexe de septines UNC-59/UNC-61 : Le complexe de septines de *Caenorhabditis elegans* est non polaire

1.1 Avant propos

Dans cette partie, je présente les résultats de travaux menés avec la doctorante Corinne John afin de comprendre la structure et l'arrangement moléculaire des septines UNC-59 et UNC-61 de *C. elegans* que j'avais cloné puis caractérisé dans la formation de filaments de septine dans *S. cerevisiae*.

Publication : Corinne M John, Richard K Hite, Christine S Weirich, Daniel J Fitzgerald, Hatim Jawhari, **Mahamadosu Faty**, Dominik Schläpfer, Ruth Kroschewski, Fritz K Winkler, Tom Walz, Yves Barral, and Michel O Steinmetz (2007) *The Caenorhabditis elegans septin complex is nonpolar*. EMBO J. 2007 July 25; 26(14): 3296–3307 [annexe 2].

1.2 Introduction

Nous avons utilisé une combinaison de méthodes de biologie cellulaire, de biochimie et de microscopie électronique (ME) afin de mieux comprendre l'organisation structurale du complexe de septines UNC-59/UNC-61.

Nous montrons que UNC-59 et UNC-61 forment un complexe hétérotétramérique capable de s'associer en structures d'ordre supérieur dans les cellules et en filaments *in vitro*. Nous avons également trouvé que les domaines C-terminaux de UNC-59 et de UNC-61 forment des superhélices doubles brins parallèles enroulées et que le complexe hétérotétramérique de septines est assemblé à partir d'hétérodimères UNC-59/UNC-61.

Les études en ME montrent que l'hétérotétramère UNC-59/UNC-61 est une structure allongée en forme de tige composée de deux sous-unités centrales UNC-61 flanquées de deux sous-unités UNC-59 et que les superhélices hélicoïdales de UNC-59/UNC-61 s'étendent latéralement de l'hétérotétramère. L'ensemble de nos résultats met en lumière l'arrangement moléculaire des monomères dans le complexe de septines et suggèrent que les complexes de septines s'assemblent dans les filaments et les structures d'ordre supérieur de manière non polaire.

1.3 Résultats

1.3.1 Les septines de *C. elegans* forment des structures d'ordre supérieur *in vivo*

Bien qu'il ait été démontré que les septines UNC-59 et UNC-61 se localisent au fuseau de clivage chez les jeunes embryons, il n'est pas clair si elles s'assemblent en filaments *in vivo* [Nguyen *et al.*, 2000; Finger *et al.*, 2003]. Afin d'examiner leur capacité à former des filaments dans les cellules, nous avons étudié leurs polymérisation lorsqu'elles sont exprimées dans les levures et les cellules d'insectes.

UNC-59 et UNC-61 exprimées seules diffusent dans tout le cytoplasme de la levure et apparaissent au cou du bourgeon dans 8% des cellules bourgeonnées (Figure 21B et C). GFP-UNC-61 exprimée seule a montré une localisation similaire et était présente au cou du bourgeon avec une fréquence légèrement plus élevée (Figure 21B et C). Dans certains cas, des structures ponctuées ont été observées, qui correspondrait vraisemblablement à des agrégats de septines. Lorsque GFP-UNC-59 et UNC-61 sont co-exprimées, le nombre de cellules de levure avec un col de bourgeon marqué par la GFP augmente et atteint 73% (Figure 21B et C). De plus, des structures filamenteuses qui s'étendent du cou du bourgeon dans la cellule mère ont été plus fréquemment observées (Figure 21B). L'ensemble de ces données indique que les deux septines de *C. elegans* sont incorporées dans des structures d'ordre supérieur dans les cellules, et qu'elles forment efficacement des structures filamenteuses uniquement lorsqu'elles sont coexprimées. Ceci est en accord avec l'observation selon laquelle UNC-59 et UNC-61 exigent l'une et l'autre pour leur localisation correcte dans le nématode [Nguyen *et al.*, 2000].

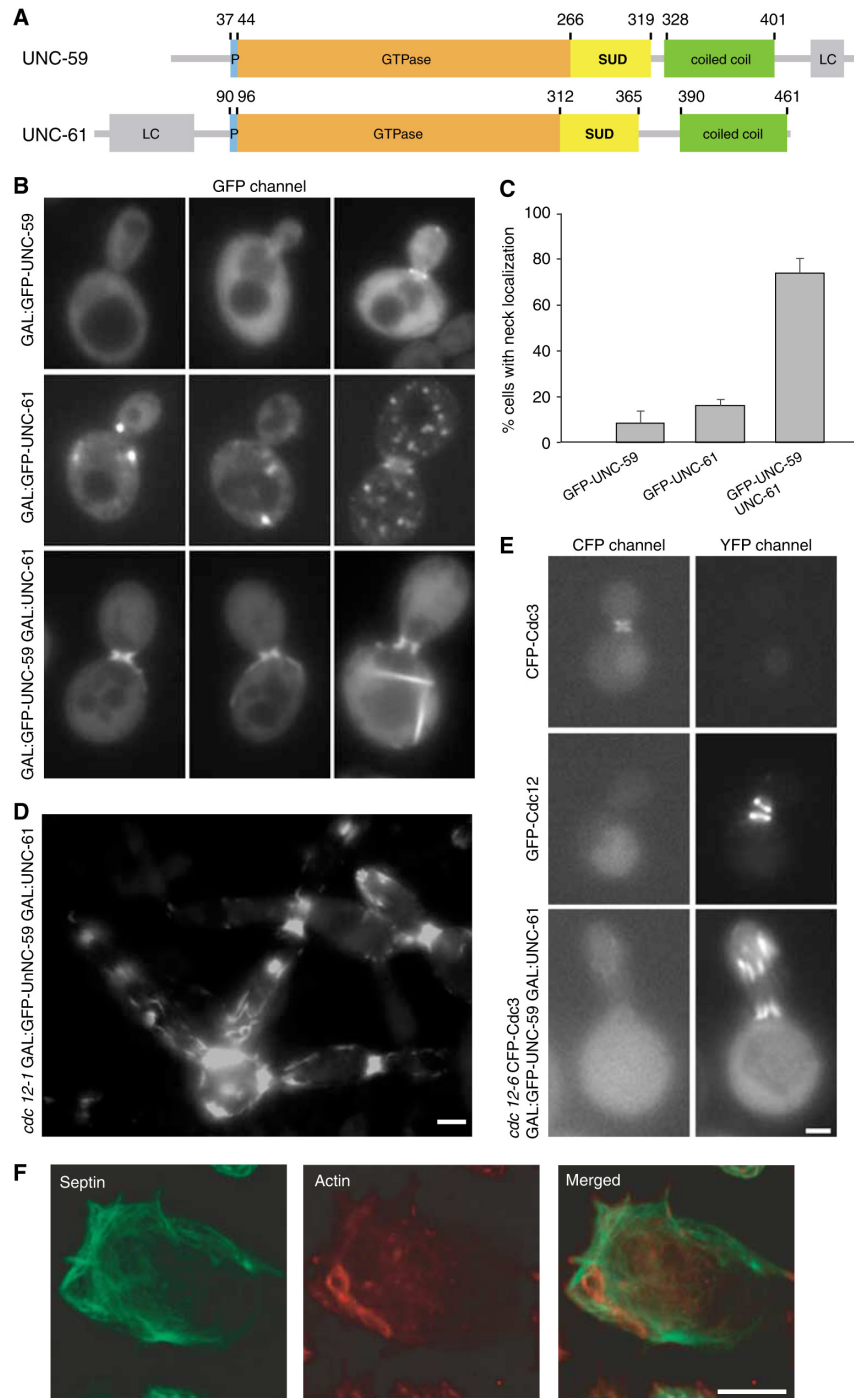


Figure 21 : Localisation des septines de *C. elegans* exprimées dans les cellules de levure et d'insecte.

(A) Représentation schématique de l'organisation du domaine des septines UNC-59 et UNC-61 de *C. elegans*. Les deux septines contiennent une région polybasique (P; bleu), un domaine GTPase (orange), un domaine spécifique aux septines (SUD; jaune) et un domaine prédit en super hélice (vert). Les extrémités N- et C-terminales de UNC-61 et UNC-59 contiennent, respectivement, des régions de faible complexité (LC; gris). Les limites de domaine correspondantes sont indiquées par les positions de résidu. **(B – E)** Localisation des septines de *C. elegans* dans *S. cerevisiae* visualisée par microscopie à fluorescence. **(B)** cellules de levure type sauvage (WT) exprimant les combinaisons indiquées, marquées ou non marquées GFP, de UNC-59 et UNC-61. **(C)** Quantification des cellules bourgeonnées montrant la localisation de la septine au niveau du col du bourgeon lorsque la septine indiquée est exprimée. **(D)** Localisation typique de GFP-UNC-59 co-exprimées avec UNC-61 dans le mutant de septine *cdc12-1* après incubation pendant la nuit à température restrictive. **(E)** Localisation de CFP-Cdc3 et GFP-UNC-59 co-exprimés avec UNC-61 dans des cellules *cdc12-6* après croissance à 25 °C pendant une nuit, suivi par de 1h d'incubation à 37 °C. Comme contrôles, des levures type sauvage (WT) exprimant CFP-Cdc3 ou GFP-Cdc12 ont été visualisées dans les deux canaux YFP et CFP. **(F)** Visualisation des septines de *C. elegans* dans des cellules d'insectes SF21 par immunofluorescence indirecte. Les cellules SF21 exprimant 6xHis-UNC-59 et UNC-61 ont été colorées avec des anticorps anti-penta-His (vert) et les filaments d'actine ont été colorés avec de la rhodamine phalloïdine (rouge). Les barres d'échelle représentent 2 mm (B, D, E) et 10 mm (F). D'après John *et al.*, 2007 (annexe 2).

Pour déterminer si UNC-59 et UNC-61 forment seules des complexes ou nécessitent des septines endogènes, nous avons étudié si la perturbation des complexes de septines endogènes de levure affecte la localisation des septines du ver. Les allèles des septines *cdc12-1* et *cdc12-6* perturbent respectivement l'assemblage et la stabilité des filaments de septines de levure à la température restrictive de 37°C [Dobbelaere *et al.*, 2003]. Les cellules portant une ou l'autre mutation et exprimant à la fois GFP-UNC-59 et UNC-61 ont été placées à la 37°C avant de visualiser GFP-UNC-59 par microscopie à fluorescence (Figure 21D). Un fort signal GFP est observé au col du bourgeon de ces cellules et dans des structures filamenteuses le long du cortex cellulaire. La perturbation des complexes de septines endogènes n'affecte donc pas la capacité de UNC-59 et UNC-61 à s'assembler en structures filamenteuses. Cependant, l'observation de la croissance et les analyses morphologiques ont indiqué que la coexpression des septines de *C. elegans* était probablement incapable de compléter le manque de structure des septines endogènes. De plus, l'analyse de localisation de CFP-Cdc3 dans des cellules *cdc12-6* co-exprimant GFP-UNC-59 et UNC-61 à température restrictive montre que la localisation Cdc3 n'est pas restaurée dans ces cellules (Figure 21E). Ces résultats suggèrent que coexprimées, les septines de *C. elegans* s'assemblent en structures filamenteuses qui se localisent au col du bourgeon des cellules de levure indépendamment des septines endogènes.

Des résultats similaires ont été obtenus lorsque les deux septines de *C. elegans* sont co-exprimées dans des cellules d'insectes en utilisant un baculovirus. Une fois encore, l'expression de UNC-59 ou UNC-61 seule ne conduit pas à la formation de structures filamenteuses (données non montrées), tandis que la coexpression des deux protéines le permet (Figure 21F). L'ensemble de ces observations établit que les septines UNC-59 et UNC-61 sont nécessaires et suffisantes pour former des structures d'ordre supérieur dans les cellules.

1.3.2 Les septines de *C. elegans* forment des filaments *in vitro*

Pour comprendre la formation de complexes par les septines de *C. elegans*, nous avons ensuite exprimé et purifié UNC-59 et UNC-61 à partir de *E. coli* et de cellules d'insectes. Ni UNC-61, ni UNC-59 n'était solubles lorsqu'elles étaient exprimées seules. En revanche, la co-expression de UNC-59 et UNC-61, à partir des bactéries et des cellules d'insectes, a permis la production d'un complexe soluble. 6xHis-UNC-59 et UNC-61 co-exprimées dans l'un ou l'autre des systèmes co-éluent sur une colonne Ni-Sepharose dans un rapport de 1:1, indiquant qu'elles forment un complexe stœchiométrique. Ces résultats sont compatibles avec la nécessité de la présence des deux septines de *C. elegans* pour leur localisation cellulaire correcte (Figure 21B et C) et leurs fonctions [Nguyen *et al.*, 2000].

Nous savons que la dialyse des septines de levure purifiées contre des concentrations de sel élevées vers des concentrations faibles conduit à l'assemblage de longs filaments [Frazier *et al.*, 1998]. Nous avons donc testé la capacité de UNC-59/UNC-61 produites à partir de bactérie à former des filaments dans des conditions similaires. Les complexes de septines purifiés par affinité ont été soumis à une chromatographie par exclusion de taille et la fraction du pic principal a été isolée. Cette fraction a été dialysée contre des concentrations de NaCl de 500 mM à 20 mM et la formation de filaments a été évaluée par ultra-centrifugation et ME. Dans ces conditions, quelques filaments longs et rigides, jusqu'à 500 nm de long et 8 à 9 nm de large, ont été observés (Figure 22A). Les septines exprimées dans les bactéries sont donc capables de polymériser *in vitro*.

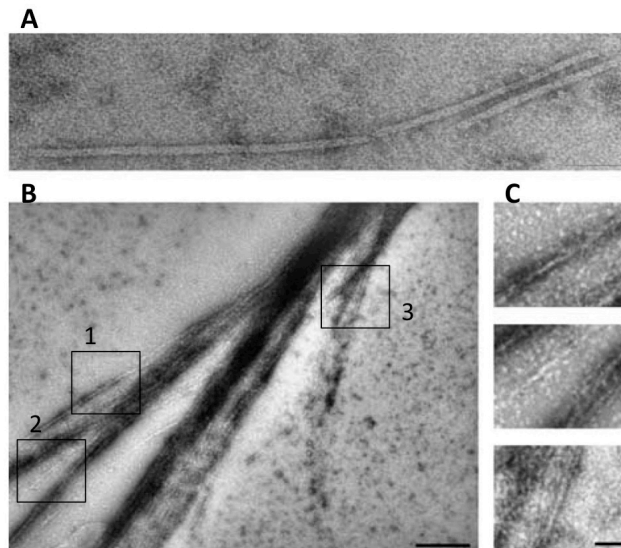


Figure 22 : Les septines de *C. elegans* forment des filaments *in vitro*. Micrographies électroniques des filaments de septines colorés négativement purifiés de *E. coli* **(A)** et de cellules d'insecte **(B, C)** après dialyse à partir de 500 mM de NaCl contre un tampon NaCl 20 mM. **(B)** Vue d'ensemble d'une feuille de filament de septines. **(C)** Agrandissement des zones indiquées 1, 2, 3 de **(B)**. La barre d'échelle représente 50 nm en **(A, C)** et 250 nm en **(B)**. D'après John *et al.*, 2007 (annexe 2).

Lorsque purifiées à partir de cellules d'insectes, les complexes de septines s'assemblent en feuilles et faisceaux filamenteux dans 20 mM NaCl (Figure 22B et C). Le nombre et l'épaisseur de ces faisceaux augmentent lorsque la dialyse est effectuée à température ambiante (Figure 22B). Les feuilles et les paquets de septines se terminent souvent par des extrémités fendues. A ces sites, la largeur des filaments de septines mesure 8 à 9 ou 16 nm (Figure 22C). Ces dimensions sont similaires à celles de filaments individuels de septines de levure, 7 à 9 nm, ou par paires, 14 à 18 nm [Frazier *et al.*, 1998 ; Versele *et al.*, 2004].

1.3.3 La sous-unité structurale des septines de *C. elegans* est un hétérodimère de *UNC-59/UNC-61*

Afin d'obtenir une image plus détaillée de la sous-unité structurale des septines de *C. elegans*, nous avons évalué la teneur en nucléotides et caractérisé la taille et la composition des complexes recombinants UNC-59/UNC-61. Dans des complexes purifiés à partir d'*E. coli* et de cellules d'insectes, la teneur en nucléotide observée est faible. Le ratio du GDP par monomère de septine était inférieur à 0,1 et aucun GTP n'a été détecté dans aucune des préparations, ce qui suggère que les septines recombinantes de *C. elegans* étaient sous-stœchiométriquement chargées de nucléotides.

Nous avons ensuite examiné la taille du complexe UNC-59/UNC-61. Les septines purifiées de bactéries et de cellules d'insectes éluent en trois pics sur le gel de filtration, chromatographie d'exclusion de taille (Figure 23A). Le premier pic correspondait au volume vide et contient les septines agrégées. A partir de l'analyse des différentes fractions de protéines sur gels de polyacrylamide en condition dénaturante suivie de la coloration en bleu Coomassie, cette agrégation représentait environ 5% des septines préparées à partir de *E. coli* (Figure 23B, ligne 1). Le deuxième pic, qui contient la plus grande fraction de la préparation (Figure 23B, lignes 2-4), a été caractérisé par sa vitesse de sédimentation et par ultracentrifugation analytique à l'équilibre (AUC). La moyenne de la masse moléculaire de cette fraction était de 203 kDa avec un coefficient de sédimentation de 4S, ce qui correspond à un tétramère allongé de UNC-59 et UNC-61. L'analyse par diffusion/diffraction dynamique de la lumière statique, *dynamic light scattering* ou *DLS*, permettant d'accéder à la taille de particules en suspension, montre que le troisième pic du chromatogramme d'exclusion de taille correspond à un dimère (Figure 23B, lignes 5-7) avec un poids moléculaire de 113 kDa. Comme UNC-59 et UNC-61 co-éluées par affinité et exclusion de taille chromatographique ont un rapport de 1:1, ces résultats indiquent que le nombre de sous-unités des complexes de septines UNC-59 et UNC-61 est à la fois dimérique et tétramérique.

Pour tester la stabilité des complexes tétramériques et dimériques, nous avons analysé ces fractions par chromatographie d'exclusion de taille. La fraction de tétramères réinjectée est restée principalement tétramérique, bien qu'une fraction se soit dissociée en dimères (Figure 23D ligne noire). Les poids moléculaires déterminés par *SLS* sont de 236 et 113 kDa, respectivement. De même, la fraction de dimères réinjectée a montré une tendance significative à s'associer en tétramères (Figure 23D, ligne noire pointillée). Cette tendance augmente jusqu'à quatre fois la concentration de la fraction de dimères (Figure 23D, ligne grise).

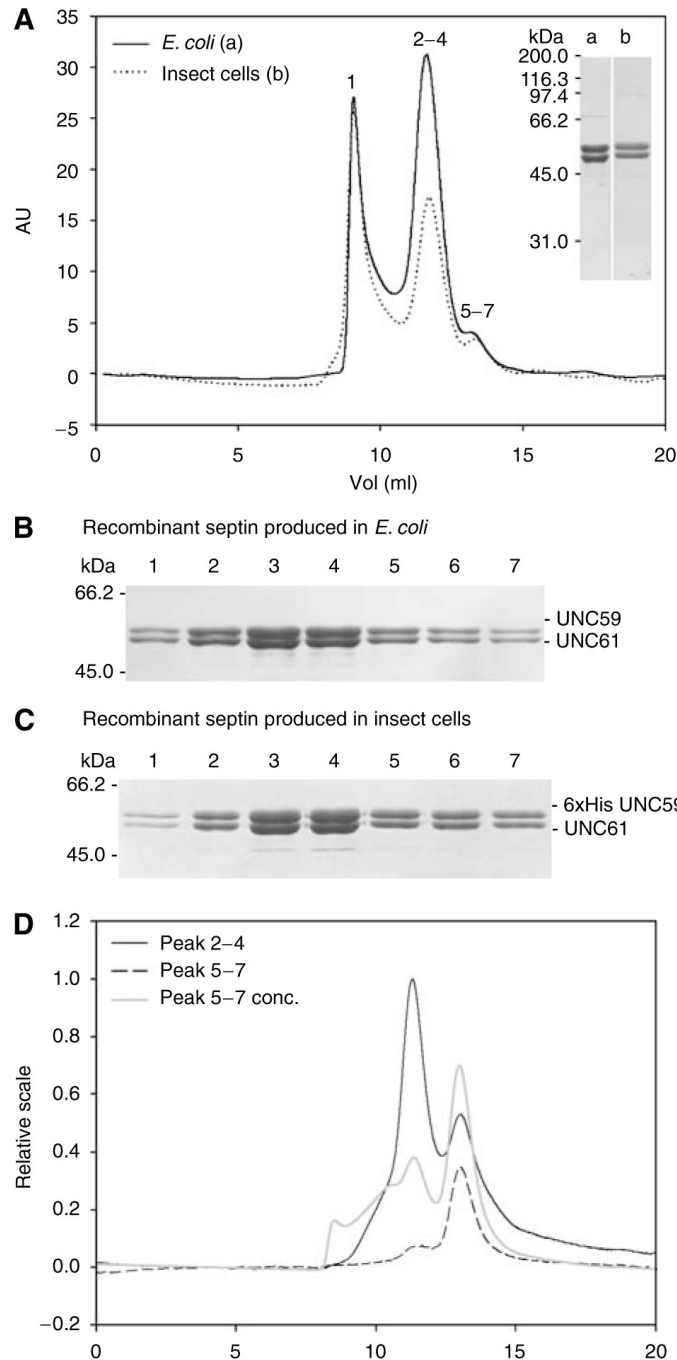


Figure 23 : Analyse du complexe UNC-59 / UNC-61 par chromatographie d'exclusion de taille. **(A)** Complexes de septines exprimées dans *E. coli* (trait plein, 100 μ l de 3 mg / ml injecté) ou dans des cellules d'insectes (ligne pointillée; 100 μ l de 1 mg / ml injecté) et purifiées par affinité ont été analysées sur une colonne Superdex 200. Les nombres au dessus des pics correspondent aux lignes dans l'analyse par SDS – PAGE (coloré au bleu de Coomassie) des septines produites dans *E. coli* **(B)** ou dans les cellules d'insectes **(C)**. Pour la comparaison par SDS–PAGE des septines (6xHis-UNC-59 / UNC-61) produites dans les bactéries (a) ou dans les cellules d'insecte (b), voir encadré en (A). **(D)** Analyse des fractions de tétramères et de dimères. Les fractions de tétramères (2-4) (trait noir; 100 μ l de 0,5 mg / ml injecté), les fractions de dimères (5-7) (ligne pointillée noire; 100 μ l de 0,05 mg / ml injecté) et une fraction de dimères concentrée quatre fois (ligne grise; 100 μ l de 0,2 mg / ml injecté) ont été re-chromatographiées sur une colonne Superdex 200. D'après John *et al.*, 2007 (annexe 2).

Les septines de *C. elegans* co-exprimées dans les cellules d'insectes ont également été analysées. 6xHis-UNC-59 et UNC-61 co-éluent sur une colonne de Ni-Sépharose selon un ratio de 1:1. L'analyse de ce complexe par chromatographie d'exclusion de taille conduit à un chromatogramme similaire (Figure 23A, ligne pointillée) avec une distribution de pic et une stabilité similaires des complexes (Figure 23A et C).

L'ensemble de ces données indique que les septines produites dans les cellules d'insectes et les bactéries se comportent de la même manière. Dans les deux cas, les complexes hétérotétramériques, résultant de la dimérisation des hétérodimères UNC-59/UNC-61, forment la fraction protéique principale. Comme le complexe hétérotétramérique est capable de polymériser (Figure 22), il représente probablement les blocs de base de construction des filaments de septines.

1.3.4 Les superhélices des septines de *C. elegans* forment des hétérodimères parallèles

Pour déterminer les interactions protéine-protéine au sein du complexe hétérotétramérique des septines, nous avons analysé le rôle des domaines hélicoïdaux de UNC-59 et de UNC-61. Les deux septines exprimées seules sans leurs domaines hélicoïdaux sont insolubles et montrent une forte tendance à précipiter lorsqu'elles sont co-exprimées, suggérant que la délétion de ces domaines déstabilise les protéines.

Nous avons ensuite examiné les interactions homo et hétérotypiques des domaines superhélices de UNC-59 (résidus 328-401, cc^{UNC59}) et UNC-61 (résidus 390-451, CC^{UNC61}) par spectroscopie par dichroïsme circulaire (CD). Cette méthode repose sur une absorption différenciée de la lumière selon qu'elle est polarisée circulairement à droite ou à gauche. Les chromophores biologiques, comme les protéines, ont des spectres d'absorption CD dans la région des ultraviolets lointains distincts qui dépendent de leur structure.

À 5°C, cc^{UNC59} (9,0 kDa) et cc^{UNC61} (8,8 kDa) ont montré des spectres CD ultraviolet lointain (UV) avec un minimum à 205 nm et 222 nm (Figure 24A), caractéristique des protéines à contenu de 30% à 35% hélicoïdal. Les expériences de dépliage thermique ont révélé de larges transitions, indiquant que les domaines hélicoïdaux sont en grande partie dénaturés à 30°C (Figure 24A, encart). Les

expériences d'équilibre de sédimentation de cc^{UNC59} et de cc^{UNC61} à 4°C ont donné dans les deux cas, des masses moléculaires moyennes de 14 kDa, un équilibre entre les monomères et les homodimères.

En revanche, le spectre CD UV lointain d'un mélange 1:1 cc^{UNC59} et cc^{UNC61} suggèrent un contenu hélicoïdal d'environ 65% (Figure 24A). Le dépliage thermique a révélé un profil de forme sigmoïdale de fusion avec un point médian de transition, T_m , centré à 31°C (Figure 24A, encart). Le spectre CD et le profil de fusion sont caractéristiques de structures hélicoïdales modérément stables [Steinmetz *et al.*, 1998]. L'équilibre de sédimentation (AUC) a révélé une masse de 17 kDa, correspondant à un dimère de cc^{UNC59} et cc^{UNC61} . Ainsi, cc^{UNC59} et cc^{UNC61} s'assemblent préférentiellement en structures spiralées hétérodimériques.

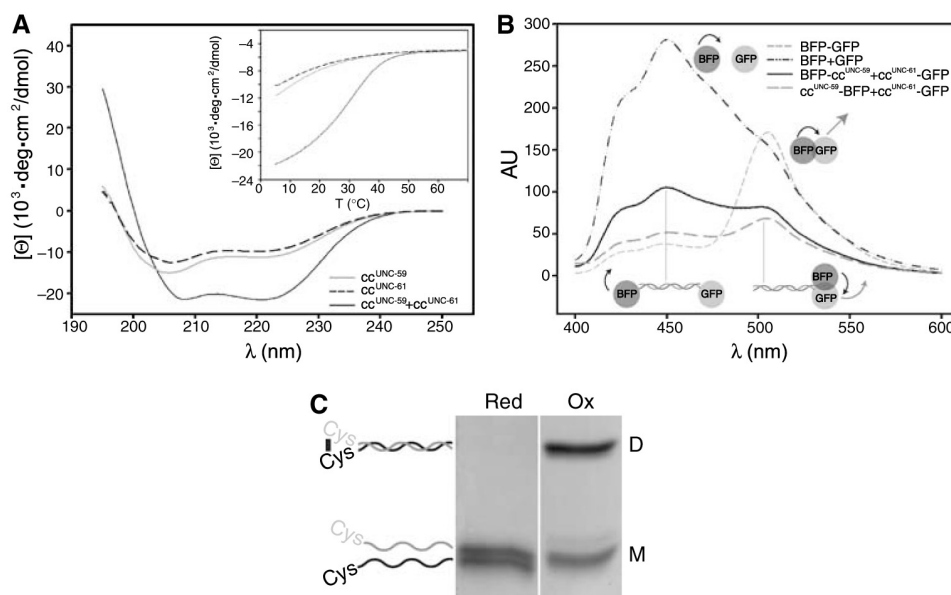


Figure 24 : Analyse des domaines superhélices enroulées de UNC-59 et UNC-61.

(A) Spectres de CD UV lointain de cc^{UNC59} (ligne grise), cc^{UNC61} (ligne pointillée), et cc^{UNC59} et cc^{UNC61} mélangés dans un rapport équimolaire (trait plein). **(B, encadré)** Profil de dépliement thermique enregistré par CD à 222 nm. **(B, C)** Analyse de l'orientation des super hélices enroulées des septines. **(B)** Efficacité FRET des fractions solubles de cellules exprimant respectivement $cc^{UNC59}BFP$ et $cc^{UNC61}GFP$ (trait plein) ou $BFPcc^{UNC59}$ et $cc^{UNC61}GFP$ (grande ligne pointillée). Contrôle positif: BFP-GFP (petite ligne en pointillés); contrôle négatif: BFP et GFP (pointillé / petits points). **(C)** SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie de $CGGcc^{UNC59}$ mélangée en rapport équimolaire avec $CGGcc^{UNC61}$ sous l'effet de conditions réductrices (rouge) ou oxydante (ox). Les positions de migration des monomères (M) et des dimères (D) sont indiquées schématiquement. D'après John *et al.*, 2007 (annexe 2).

L'orientation relative de cc^{UNC59} et de cc^{UNC61} au sein de la bobine spiralée hétérodimérique a été déterminée par des expériences de transfert d'énergie de résonance fluorescente (FRET) et de *crosslinking*. Pour les expériences de FRET, cc^{UNC59}

a été marqué soit en N-terminal ou C-terminal avec la BFP et testé pour sa capacité à agir en tant que donneur FRET pour cc^{UNC61}-GFP. La combinaison de cc^{UNC59}-BFP et cc^{UNC61}-GFP, mais sans BFP-cc^{UNC59} et cc^{UNC61}-GFP, entraîne un transfert d'énergie (Figure 24B), indiquant que les domaines hélicoïdaux des septines se placent de façon parallèle. Cette interprétation a été confirmée par des expériences de *crosslinking* de cystéines [Harbury *et al.*, 1993] dans lesquelles les constructions de cc^{UNC59} et de cc^{UNC61} ont été conçues pour contenir une cystéine N-terminale, suivie de deux glycines flexibles (CGGcc^{UNC59} et CGGcc^{UNC61}). Ces protéines ont été mélangées selon un ratio de 1:1 et analysées sur des gels SDS-PAGE en conditions réductrices et non réductrices pour séparer les monomères des dimères liés par ponts disulfures (Figure 24C). Conforme au *crosslinking* des disulfures Cys-Cys, les dimères observés dans des conditions non réductrices ont été résolus en monomères dans des conditions réductrices. En revanche, presque aucun *crosslink* n'a été observée en utilisant le CGGcc^{UNC59} et CGGcc^{UNC61}. Ensemble, ces données montrent que cc^{UNC59} et cc^{UNC61} s'assemblent en hétérodimères, leurs superhélices enroulées parallèlement.

1.3.5 L'hétérotétramère de septines est un complexe allongé de UNC-59/UNC-61/UNC-61/UNC-59

Afin comprendre son architecture, nous avons visualisé par microscopie électronique l'hétérotétramère UNC-59/UNC-61. Les micrographies de coloration négative de complexes 6xHis-UNC-59/UNC-61 de la fraction tétramérique (Figure 23A) ont montré des particules allongées (Figure 23A).

Après classification des images et leurs moyennes, ces particules apparaissent comme quatre densités globulaires disposées linéairement, chacune représentant une sous-unité au sein du tétramère (Figure 25A, huit premiers panneaux). Ces particules font environ 17 à 19 nm de long et 5 à 7 nm de large, similaire aux largeurs de 7-9 nm mesurées pour les filaments de septines de nématode (Figure 22), de la levure et des mammifères [Field *et al.*, 1996; Frazier *et al.*, 1998; Kinoshita *et al.*, 2002; Versele et Thorner, 2004]. Le panneau 9 de la Figure 25A montre une particule avec seulement deux densités, qui correspondent très probablement au dimère observé par chromatographie d'exclusion de taille (Figure 23A et 23D).

L'ensemble de ces résultats est compatible avec la formation de sous-unités hétérotétramériques linéaires et stables par les septines de *C. elegans* UNC-59/UNC-61.

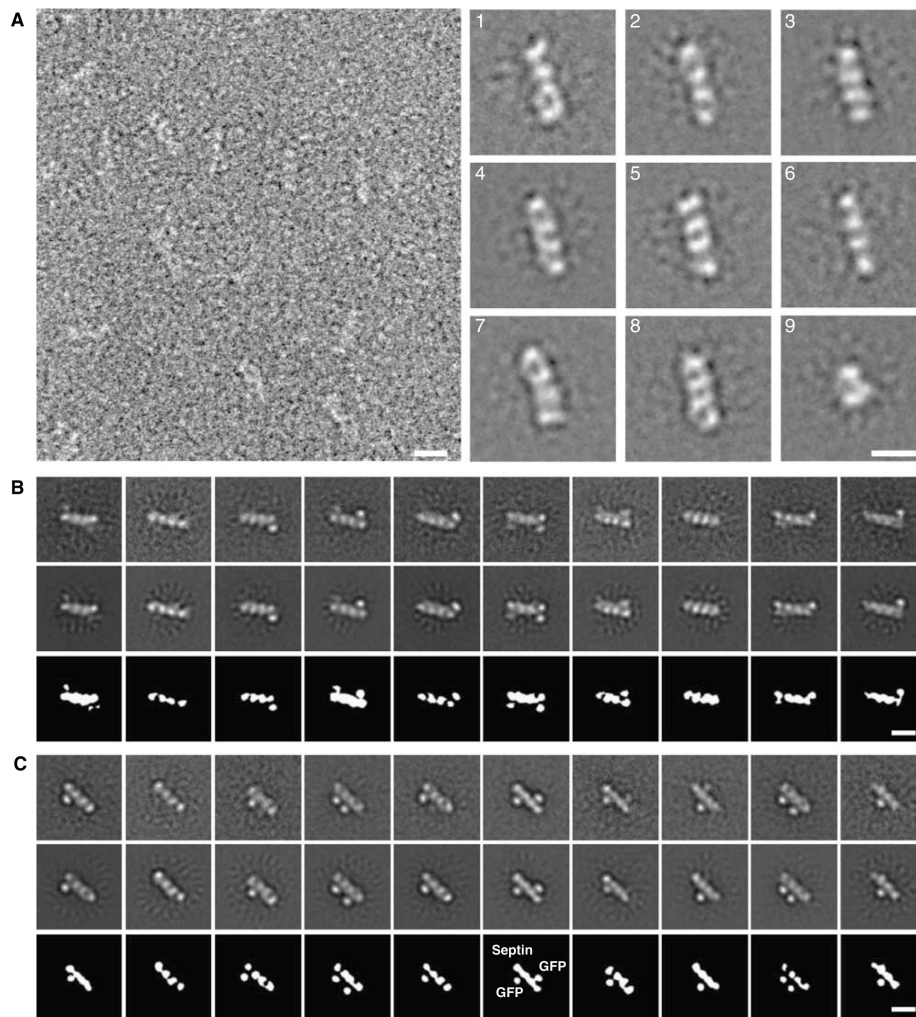


Figure 25 : Microscopie électronique de complexes de septines.

(A) Micrographie électronique et moyennes de projection des hétérotétramères 6xHis-UNC-59/UNC-61 exprimés dans *E. coli* et colorés négativement. Les complexes de septines se colorent mal, ce qui rend difficile la vision des molécules linéaires de septines. Les huit premiers panneaux montrent des moyennes obtenues à partir de classes représentatives d'hétérotétramères de septines contenant quatre densités disposées linéairement. Le dernier panneau est une moyenne des hétérodimères, qui ne sont composés que de deux densités. **(B)** Moyennes des projections des hétérotétramères GFP-UNC-59 (23–459)/6xHis-UNC-61 colorés négativement. Les panneaux du haut affichent dix moyennes de classe représentatives de l'alignement multi-référence en utilisant des images brutes sélectionnées au hasard comme références initiales. Ces moyennes ont été utilisées comme références d'entrée pour le deuxième tour d'alignement multi-références, dont les sorties sont affichées dans la rangée du milieu. Les diagrammes schématiques des moyennes du deuxième alignement sont indiqués dans la rangée inférieure. **(C)** Moyennes de projection des hétérotétramères 6xHis-UNC-59/GFP-UNC-61 (77-461) colorés négativement. Les panneaux supérieurs montrent dix moyennes de classes représentatives à partir de l'alignement multi-référentiel en utilisant des références aléatoires. Ces moyennes ont été utilisées comme références d'entrée pour le deuxième tour d'alignement multi-référentiel, dont les sorties sont affichées dans la rangée du milieu. Les schémas des moyennes du deuxième alignement sont montrés dans la rangée du bas. Toutes les barres d'échelle représentent 10 nm. D'après John *et al.*, 2007 (annexe 2).

Pour déterminer la position de UNC-59 dans le tétramère, une étiquette GFP N-terminale a été fusionnée au segment des résidus 23 à 459 de UNC-59. GFP-UNC-59(23-459)/6xHis-UNC-61 purifiée par affinité se comporte de manière similaire à UNC-59/UNC-61, co-éluant en chromatographie d'exclusion de taille en tant que tétramère (données non montrées). Les complexes marqués par GFP ont été analysés par microscopie électronique (ME) (Figure 25B). Les moyennes des classes ont révélé les densités des GFP en plus des quatre densités linéaires du tétramère de septines. Bien que plusieurs classes n'ont pas permis de résoudre l'un des domaines GFP, les moyennes de certaines classes ont clairement montré la position d'au moins un GFP. Afin d'améliorer le rapport signal sur le bruit de fond des moyennes, nous avons sélectionné 10 classes représentatives et les avons utilisées comme entrées pour un deuxième alignement multi-directionnel (Figure 25B, rangée du haut). Les moyennes de classe résultantes sont très similaires aux images d'entrée, mais avec des caractéristiques plus claires (Figure 25B, rangée du milieu). Dans ces moyennes, le domaine GFP est localisé aux densités terminales de l'hétérotétramère, suggérant que la UNC-59 est située aux extrémités du complexe de septines.

Pour confirmer ce résultat, nous avons marqué 6xHis-UNC-59/UNC-61 avec des fragments Fab dirigés contre l'étiquette 6xHis à l'extrémité N-terminale de UNC-59 (Figure 26). Dans les molécules marquées, le fragment Fab se localise à l'une ou aux deux extrémités du tétramère de septines en accord avec l'expérience d'étiquetage GFP, indiquant que UNC-59 localise aux extrémités des hétérotétramères.

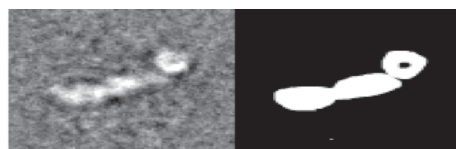


Figure 26 : Moyenne de projection et image brute d'un hétérotétramère UNC-59/UNC-61 en complexe avec un fragment fab α -His négativement colorés. D'après John *et al.*, 2007 (annexe 2).

Nous avons également identifié la position de UNC-61 dans l'hétérotétramère en utilisant l'étiquette GFP. Pour se faire, nous avons généré une construction contenant une étiquette GFP N-terminale fusionnée à UNC-61 au segment des résidus de 77 à 461. 6xHis-UNC-59/GFP-UNC-61(77-461) co-élue en tétramères sur chromatographie d'exclusion de taille, ce qui suggère que la région désordonnée prédite de UNC-61 est

nécessaire pour la formation de tétramères. Les complexes 6xHIS-UNC-59/GFP-UNC-61(77-461) purifiés ont été observés par ME et les particules ont été alignées en utilisant deux séries d'alignement multirésident comme pour GFP-UNC-59(23-459)/6xHIS-UNC-61. Les moyennes de classe qui ont été utilisées comme références d'entrée pour un deuxième alignement multi-directionnel sont représentés sur la figure 25C, rangée en haut, et les moyennes de classe résultantes sont indiquées en dessous, rangée du milieu. Le domaine GFP semble être quelque peu flexible. Cependant, il est clairement localisé aux densités centrales, plaçant les sous-unités UNC-61 au centre de l'hétérotétramère.

Nos données de ME suggèrent fortement que l'hétérotétramère correspond à l'assemblage queue-à-queue d'hétérodimères en un complexe allongé UNC-59/UNC-61/UNC-61/UNC-59 et est donc symétrique le long de son axe longitudinal.

1.3.6 Les superhélices enroulées s'étendent latéralement à partir du noyau du tétramère de septines

Pour déterminer la position des domaines superhélices dans le complexe hétérotétramérique de septines, nous avons fusionné GFP à l'extrémité C-terminal qui correspond à l'extrémité du domaine hélicoïdal de UNC-61 (Figure 21A). La GFP a été introduite à l'extrémité de la superhélice enroulée, car une superhélice à deux brins enroulés n'a pas la masse suffisante pour être visualisée par coloration négative en ME. 6xHis-UNC-59/UNC-61-GFP purifiée par affinité se comporte de la même manière que UNC-59/UNC-61 durant la chromatographie d'exclusion de taille, en éluant principalement sous la forme de tétramères ayant un poids moléculaire de 256 kDa, tel que déterminé par *SLS*. La visualisation de ce complexe par ME a révélé que la densité de la GFP se trouve à distance de l'hétérotétramère (Figure 27A). En raison de cette variabilité structurelle inhérente, la plupart des moyennes ont résolues seulement un des deux GFP, tandis que l'autre était en dehors de la moyenne. Cela implique que les deux bobines spiralées hétérodimériques s'étendent latéralement à partir de l'hétérotétramère. Rappelant les "brins fins" précédemment visualisés par ME en ombrage métallique rotatif [Hsu *et al.*, 1998], les domaines hélicoïdaux semblent se projeter vers l'extérieur de l'hétérotétramère de septines selon une variété d'angles, résultant en l'apparition de la GFP dans diverses positions par rapport au centre de l'hétérotétramère.

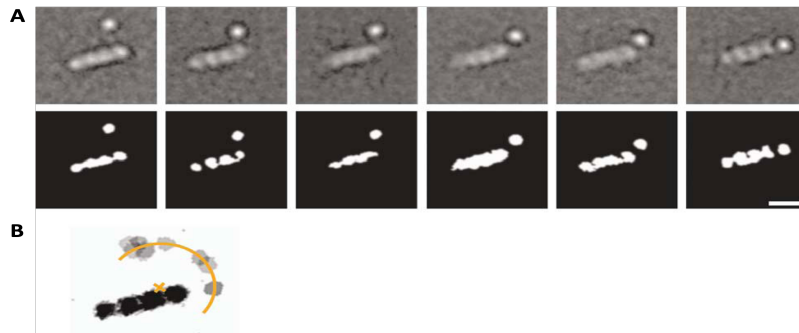


Figure 27 : Flexibilité du domaine en spirale.

(A) Six moyennes de classes représentatives des complexes UNC-59/UNC-61-GFP montrant une GFP résolue. La GFP est située à différentes positions par rapport au noyau hétérotétramère, démontrant la flexibilité de la spirale enroulée à la jonction des septines. Les barres d'échelle représentent 10 nm. **(B)** Représentation schématisque obtenue en superposant neuf moyennes de classes de 6xHis-UNC-59/UNC-61-GFP colorées négativement. Les moyennes avec le fragment GFP à une distance maximale des quatre domaines globulaires alignés ont été choisies. Les domaines enroulés en spirale occupent un demi-cercle autour d'un hétérodimère. Le centre se situe à l'interface entre les domaines globulaires UNC-59 et le UNC-61. Le rayon est d'environ 10 nm. D'après John *et al.*, 2007 (annexe 2).

Lorsque nous considérons les moyennes des distances dans lesquelles les particules de GFP sont situées par rapport aux quatre densités globulaires alignées, ces GFP forment un arc de cercle avec un rayon constant par rapport au noyau de l'un ou l'autre hétérodimère (Figure 27B). Le rayon du demi-cercle GFP est de 10 nm, ce qui correspond à la longueur prévue de la superhélice enroulée UNC-59/UNC-61. Ces données indiquent donc que la superhélice enroulée hétérodimérique émane d'un point entre les domaines globulaires de l'hétérodimère UNC-59/UNC-61 et que la jonction entre la bobine et les domaines globuleux sont flexibles.

1.4 Discussion

Les aspects cruciaux de la fonction et du mécanisme des filaments du cytosquelette d'une cellule sont directement liés à l'organisation moléculaire de ses composants de base. Afin d'élucider l'organisation précise de l'unité de structure des septines, nous avons étudié l'organisation structurale des septines UNC-59 et UNC-61 de *C. elegans*.

La co-expression de UNC-59 et UNC-61 dans *S. cerevisiae*, dans des cellules d'insectes ou d'*E. coli* a révélé que ces deux septines sont nécessaires et suffisantes pour la formation de structures d'ordre supérieur dans les cellules et de filaments *in vitro*, et ceux-ci sont fonctionnellement similaires à d'autres assemblages de septines plus

complexes [Field *et al.*, 1996; Frazier *et al.*, 1998; Kinoshita *et al.*, 2002; Mendoza *et al.*, 2002; Sheffield *et al.*, 2003; Versele *et al.*, 2004]. *In vivo*, ces filaments hétérologues se forment et se localisent indépendamment des septines endogènes. Ainsi, les septines UNC-59 et UNC-61 de *C. elegans* représentent un système minimal pour étudier la structure moléculaire du noyau de septines.

Notre analyse biochimique a révélé que UNC-59 et UNC-61 exprimées recombinantes sont sous-stœchiométriquement chargées en nucléotide guanilique (<0.1) et n'ont pas de GTP détectable. Ce résultat contraste avec les études des septines de *S. cerevisiae* montrant que les complexes recombinants ou endogènes sont entièrement complexés avec des nucléotides et ont un rapport GDP:GTP de 2,3:1 [Vrabioiu *et al.*, 2004; Farkasovsky *et al.*, 2005]. Cette différence peut être due à une limitation de nos méthodes d'expression et de purification ou à une différence entre les septines de nématode et de levure spécifique à l'espèce. Plus précisément, parce que *C. elegans* n'a que deux gènes de septines, il est possible que des facteurs supplémentaires soient requis pour la liaison complète des nucléotides par UNC-59 et UNC-61. De plus, l'hydrolyse du GTP est susceptible de réguler certains aspects de l'assemblage des complexes en ordre supérieur. Ainsi, l'absence d'un facteur supplémentaire peut également expliquer la formation inefficace de filaments par UNC-59 et UNC-61 que nous avons observé chez la levure (Figure 22).

Cependant, notre analyse établit que UNC-59 et UNC-61 s'assemble obligatoirement en un hétérodimère qui, à son tour, s'assemble en un hétérotétramère stable (Figure 23). La formation de l'hétérodimère requière l'interaction entre les domaines hélicoïdaux parallèles de UNC-59 et UNC-61 (Figures 24, 28A et B). Ces données sont cohérentes avec les observations que les paires de septines hSep6/hSep7 et Cdc3/Cdc12, orthologues de la paire UNC-61/UNC-59, interagissent via leurs enroulements hélicoïdaux [Sheffield *et al.*, 2003; Versele *et al.*, 2004]. Les hétérodimères UNC-59/UNC-61 se dimérisent pour former un hétérotétramère allongé. Le long du grand axe du noyau tétramérique, des arrangements de sous-unités pourraient entraîner une organisation symétrique ou asymétrique d'hétérodimères.

L'analyse en ME des tétramères étiquetés avec la GFP sur la sous-unités UNC-59 ou UNC-61, ainsi que les tétramères avec des fragments Fab anti-His, a indiqué que le noyau des tétramères de septines est formé par des interactions homotypiques entre les

sous-unités de UNC-61 le long de son axe longitudinal, avec un double axe de symétrie perpendiculaire à celui-ci (Figures 25B, C et 28C et Figure 26). La largeur de la sous-unité du tétramère (5 à 7 nm) et la longueur d'un filament de septines unique (8 à 9 nm) suggèrent que les sous-unités s'assemblent le long de cet axe, vraisemblablement par le biais des interactions UNC-59/UNC-59. Comme l'axe double de la sous-unité des septines de *C. elegans* est perpendiculaire à cette direction, la croissance du filament résultant est non polaire (Figure 28C). Bien que les domaines hélicoïdaux n'étaient pas visibles dans nos préparations en ME, nous étions en mesure de visualiser l'extrémité de la superhélice enroulée en utilisant un marquage GFP. Les images résultantes ont indiqué que les superhélices enroulées étaient flexibles autour de leur point d'origine et qu'elles s'étendent latéralement du noyau hétérotétramérique (Figure 27). Si nous supposons que la croissance du filament se produit par l'addition de tétramères le long du grand axe du noyau de septines, alors les superhélices enroulées sont disponibles pour faire des contacts latéraux avec d'autres filaments de septines dans le cas des faisceaux et des feuilletts de septines.

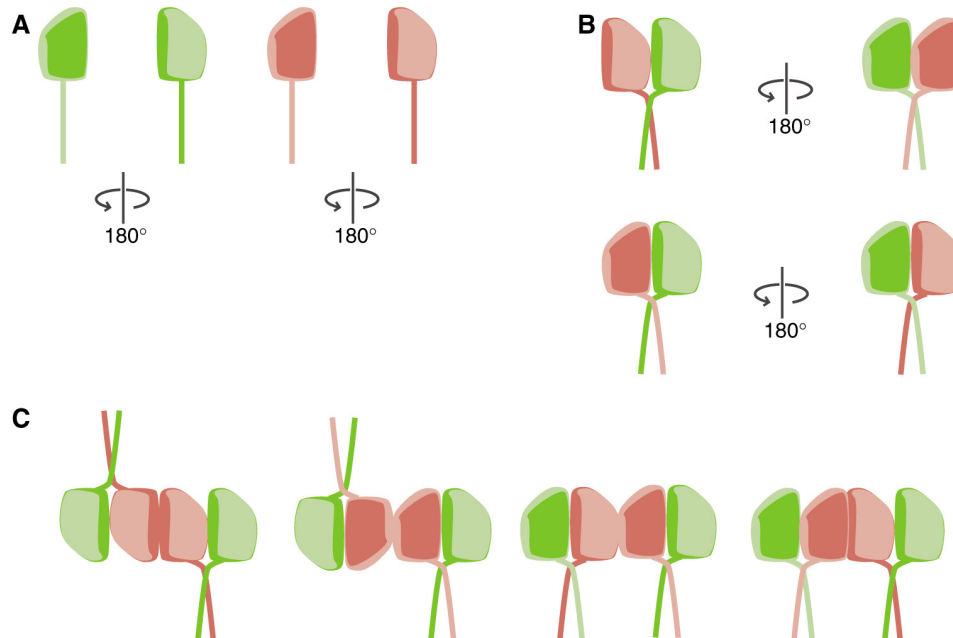


Figure 28 : Organisation moléculaire du complexe hétérotétramérique de septines.

(A) Représentations schématiques de UNC-59 (vert) et UNC-61 (rouge), montrant leurs domaines GTPase et leurs domaines en super hélices (tige). Les domaines GTPase ne sont pas symétriques *en interne*, comme représenté par la face supérieure de la protéine (arbitraire) représentée en vert pâle ou en rose, et la partie inférieure en vert foncé ou rouge. **(B)** L'hétérodimère de septines interagit via ses domaines globulaires et ses super hélices enroulées parallèles. Les diagrammes montrent deux modes d'interaction possibles entre UNC-59 et UNC-61: « haut » à « haut », où UNC-59 et UNC-61 sont dans la même orientation « en haut » et « en haut » à « en bas », dans lesquelles ils sont opposés (en bas). **(C)** Tous les modèles de formation d'hétérotétramères exigent que deux des trois axes soient non polaires. Deux des hétérodimères UNC-59/UNC-61 dimérisent le long de leur axe longitudinal (axe X). Un axe de symétrie double entre les deux hétérodimères UNC-59/UNC-61 est perpendiculaire au plan du dessin (axe Z). Ainsi, la sous-unité tétramérique des septines est non polaire le long de X. Dans les deux premiers modèles, le tétramère est également symétrique le long de l'axe des Y, mais asymétrique le long de l'axe Z. Dans les deux autres modèles, le tétramère est asymétrique le long de l'axe des Y, mais symétrique le long de l'axe des Z. D'après John *et al.*, 2007 (annexe 2).

Les assemblages parallèles de filaments de septines forment des feuilles étroitement associées à la membrane plasmique [Byers *et al.*, 1976]. Fait intéressant, notre modèle (Figure 28) conduit à un arrangement dans lequel les feuillettes de septines ont des faces de polarités distinctes, en accord avec les données indiquant qu'une face de l'assemblage de septines engage la membrane, tandis que l'autre face est exposée au cytoplasme. Nous proposons que, dans un feuillet de septines, tous les axes dans le plan de la feuille sont non polaires, mais l'axe perpendiculaire à la feuille est polaire.

En conflit avec ce modèle, la localisation asymétrique de Bni4 et Hsl1 aux côtés opposés de l'anneau de septines est supposée dépendre de la polarité intrinsèque des septines [Gladfelter *et al.*, 2001]. Cependant, nous avons observé que les mutants de Hsl1 qui ne parviennent pas à interagir avec l'anneau de septines localisent de manière polaire dans la cellule et s'accumulent spécifiquement au cortex du bourgeon [Y. Barral, résultat non publié], suggérant que la polarité de Hsl1 n'est pas assurée par la polarité intrinsèque des septines, mais plutôt par un mécanisme indépendant des septines. Cette conclusion est soutenue par une étude de Bni4 et Kcc4 dans la levure, suggérant que le cytosquelette d'actine est impliqué dans la distribution asymétrique de ces protéines [Kozubowski *et al.*, 2005].

Notre modèle du noyau du complexe de septines est compatible avec les données génétiques et protéomiques rapportées pour les complexes de septines de *S. cerevisiae* [Versele *et al.*, 2004; Farkasovsky *et al.*, 2005]. Les deux septines essentielles Cdc3 et Cdc12 forment un noyau tétramérique résistant aux protéases dans les complexes nonamériques des septines de levure [Versele *et al.*, 2004; Farkasovsky *et al.*,

2005]. Il a été proposé que l'ensemble du complexe était polaire [Versele *et al.*, 2004 ; Farkasovsky *et al.*, 2005]. À la lumière de nos données, les orthologues de UNC-59 (Cdc12) et UNC-61 (Cdc3) forment un noyau tétramérique non polaire : Cdc12-Cdc3-Cdc3-Cdc12, flanqué par de sous-unités de septines supplémentaires. On ne sait pas comment ces septines périphériques s'engagent avec le noyau tétramérique, mais une possibilité est que les sous-unités supplémentaires s'associeraient avec le noyau aux extrémités du tétramère allongé.

Ces modèles sont soutenus par des données sur les dimensions des complexes de septines; le noyau de septines de *C. elegans* est de 5 à 7 nm de large et de 17 à 19 nm de long (Figure 25), alors que le complexe de *S. cerevisiae* a environ la même largeur (7 à 9 nm), mais est plus long (32 nm) [Frazier *et al.*, 1998], comme on pourrait s'y attendre si les sous-unités sont logées à chaque extrémités.

Nos résultats décrivent l'organisation moléculaire du noyau tétramérique du complexe de septines, et suggèrent que les filaments de septines s'assemblent de manière non polaire. L'ensemble de ces résultats fournit une base moléculaire pour la compréhension de la formation des complexes de septines et leur régulation. Ces résultats suggèrent également un mécanisme pour la formation des autres structures d'ordre supérieur de septines présentant des surfaces polaires, y compris les feuilletts.

1.5 Notre modèle pour l'organisation et le fonctionnement des septines dans la levure [annexe1]

En rassemblant tous les résultats discutés et la revue des fonctions des septines au « chapitre I », nous proposons le modèle suivant pour l'organisation des septines et leur fonctionnement (Figure 29).

Les septines s'assemblent en complexes multimériques solubles (Figure 29A, B). La liaison au GTP et son hydrolyse sont nécessaire à la poursuite de la polymérisation des septines en filaments. Rapidement, après l'incorporation dans les filaments, le GTP est hydrolysé, permettant l'exposition du site de liaison aux lipides. La présence de phospholipides à proximité semble favoriser la transition vers la forme liée au GDP et la stabiliser.

L'interaction étroite des filaments de septines avec la membrane plasmique résulte de la liaison de plusieurs molécules de lipides par les molécules de septines. A

leur tour, ces interactions conduisent au recrutement et à l'enrichissement de la membrane plasmique en des phospholipides spécifiques. Ainsi, la réduction du mouvement des lipides par les polymères de septines affecte localement la fluidité de la membrane plasmique. C'est ainsi que, les filaments de septines peuvent recruter et ancrer des microdomaines lipidiques à la membrane plasmique du cou du bourgeon.

Une des conséquences du recrutement de microdomaines lipidiques par les filaments de septines est la formation d'une barrière de diffusion pour les lipides et les protéines intégrales membranaires plasmiques (Figure 29C). Les filaments de septines sont également susceptibles d'entraver la libre diffusion à travers le cou du bourgeon des protéines qui sont étroitement associées à la face cytoplasmique de la membrane plasmique. En revanche, les facteurs solubles ou plus transitoirement associés à la membrane plasmique peuvent diffuser plus librement.

En plus de la formation de filaments de septines et de l'association des lipides, l'interaction des septines avec les protéines transmembranaires peut jouer un rôle important dans l'ancrage de l'anneau de septines au niveau du cou du bourgeon. En particulier, les protéines qui s'étendent jusqu'à la paroi cellulaire sont de bons candidats pour aider à maintenir la localisation de l'anneau de septines. Ces molécules permettent de s'assurer que l'anneau de septines reste structuré et partiellement fonctionnel, même lorsque les filaments de septines sont très instables, comme dans les cellules mutantes *cdc10*^Δ.

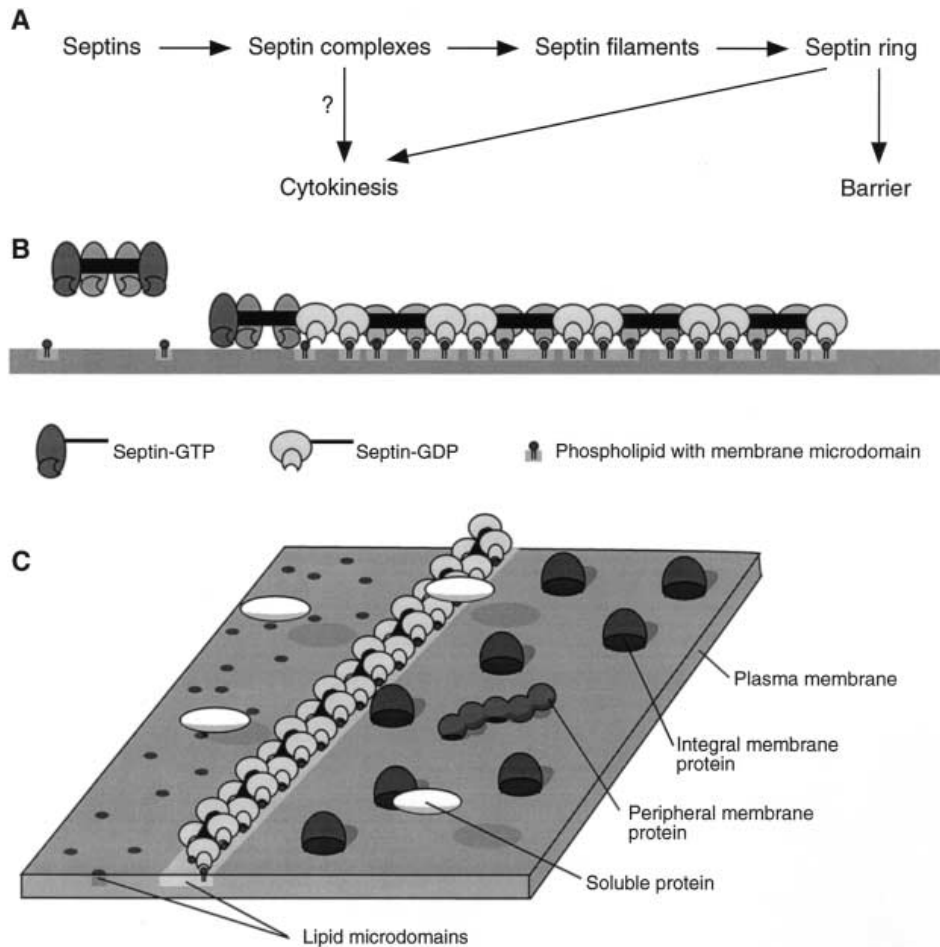


Figure 29 : Modèle pour l'organisation et la fonction des septines.

(A) Schéma de l'anneau de septine. Les monomères de septines de levure s'assemblent dans des complexes de septines. Les complexes de septines sont des sous-unités de filaments de septines. À leur tour, les filaments de septines forment l'anneau de septines. Cette structure sert à la fois d'échafaudage pour l'organisation de la machinerie cytotinétique et de barrière pour limiter la diffusion des composants corticaux à travers le col du bourgeon. **(B)** Modèle pour la polymérisation des filaments de septines à la surface de la membrane plasmique. Les septines dans les complexes solubles sont dans leur forme liées au GTP. Après association des complexes de septines à la surface de la membrane, l'hydrolyse du GTP ouvre la poche de fixation des phospholipides. La liaison de PIP2 conduit au recrutement et à l'immobilisation de ces molécules sous le filament. Il est proposé ici que cette étape aide à recruter des micro domaines lipidiques sous les filaments, modifiant ainsi la fluidité locale de la membrane plasmique. **(C)** Les filaments de septines forment une barrière contre la diffusion latérale des lipides, des protéines membranaires intégrales et protéines associées à la membrane. Cette propriété est utilisée par la cellule pour créer deux domaines membranaires avec des compositions distinctes. Les filaments de septines ne restreignent pas la diffusion des molécules solubles. D'après Faty *et al.*, 2002 (annexe 1).

1.6 Conclusion

Par analogie avec le squelette, la partie dure de notre corps autour de laquelle le reste s'organise, les structures de septines doivent être au cœur du squelette cellulaire. Plus que les microtubules et les microfilaments, les filaments de septines sont très

stables, peu dynamiques, permettant à la cellule d'organiser la polarité et la division cellulaires.

2 Résultats non publiés

Les anticorps recombinants intra cellulaires pour disséquer les fonctions des septines de *C. elegans* et de *S. cerevisiae*

2.1 Introduction

L'étude des propriétés des septines se fait par utilisation de mutants conditionnels. Il a donc été nécessaire de développer des outils de recherche facilement manipulables permettant les investigations *in vivo* dans les cellules sauvages. Notre stratégie a été d'isoler des intrabodies anti-septines.

Il a été montré que les méthodes de crible par la technique du *phage display* permettent de sélectionner des anticorps recombinants au format scFv dits conformationnels ne détectant que certains états tri-dimensionnels de la protéine ciblée [Chen *et al.*, 1999 ; Fijak *et al.*, 2006].

Nous avons utilisé la méthode de sélection de fragments d'anticorps par la technique du *phage display* pour sélectionner des anticorps anti-septines liés au GDP ou au GTP au format scFv dits conformationnels. Nous avons ainsi réussi à isoler et à produire des anticorps dirigés contre les formes de septines de *C. elegans*, UNC-59 et UNC-61, et de *S. cerevisiae*, cdc12, liées au GTP. A ces anticorps, nous avons appliqué une sélection *in vivo* en utilisant la méthode du double hybrides afin d'isoler les *intrabodies* capables de lier et de perturber les fonctions de leurs protéines cibles dans le milieu réducteur du cytoplasme.

2.2 Matériels et méthodes

2.2.1 Les souches

<i>Escherichia coli</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Top10	HF7C
F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139	MAT a ura3-52 his3-200ade2-101, lys2-801 URA3_(GAL4-17mer)3-

$\Delta(\text{ara-leu})7697$ galU galK λ^- rpsL(Str ^R) endA1 nupG	CYC1-LacZ Gal4-542, gal80-538 LYS2_GAL1-HIS3 ura3-52, his3 Δ 200
TG1 K-12 supE thi-1 $\Delta(\text{lac-proAB})$ $\Delta(\text{mcrB-hsdSM})5$, (r _K m _K)	YYB284 MAT \square ura3-62 his3 leu2 trp1- \square 63 cdc12-6
XL1 blue recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac	YYB384 MATa ura3-52 his3- \square 200 leu2- \square 1 lys2-801 ade2-101 trp1- \square 63

2.2.2 Les oligonucleotides

Ab-3'

5'-TCGACAATTGTGAGCGCTGGACTGGGCTCGAGCCctcacttgtcgtcgtcgtccttg-3'

Ab-5'

5'AGCATACATTATACGAAGTTATCGGGAATTCCctcggctgcatccggttcggctggaGCGGAGCCGGC
CATG-3'

2.2.3 Les plasmides

pACT2loxP 2 \square LEU2 ADH-GAL4 (AD) vecteur de fusion pour le système 2 hybrides

pAS2loxP 2 \square TRP1 ADH-GAL4 (DBD) vecteur de fusion pour le système 2 hybrides

pHY326-loxH *S. cerevisiae* 2 \square URA GAL vecteur d'expression pour l'expression de protéines non étiquetées

pUNI65 Kn^r, ori^{R6K} \square , loxP

pFM04 pUNI65-cdc12-ES-1-pHB-GST

pFM129 pUNI65-unc61-pHB2-GST

pFM193 GST-unc59

pFM219 pAS2-loxP/pUNI65-cdc12

pFM221 pAS2-loxP/pUNI65-cdc11

pFM223 pAS2-loxP/pUNI65-unc61

pFM225	pAS2-loxP/pUNI65-unc59
pFM226	pAS2-loxP/pUNI65-cdc10
pFM229	pACT2-loxP/pUNI65-unc59
pFM231	pACT2-loxP/pUNI65-unc61
pFM233	pACT2-loxP/pUNI65-cdc10
pFM234	pACT2-loxP/pUNI65-cdc11
pFM235	pACT2-loxP/pUNI65-cdc12

2.2.4 Le système de fusion plasmidique univector UPS

L'UPS, *Univector Plasmid fusion System*, utilise la recombinaison spécifique au site Cre-lox pour catalyser la fusion plasmidique entre l'univecteur, un plasmide contenant le gène d'intérêt, et des vecteurs hôtes contenant des informations régulatrices. Les réactions de fusion placent le gène d'intérêt sous le contrôle de nouveaux éléments régulateurs et sont sélectionnées génétiquement.

Les réactions de recombinaisons *in vitro* entre plasmides ont été effectuées dans 15 μ l.

0.2 μ g à 0.4 μ g de plasmides à recombinaison sont mélangés à 2 μ l de GST-Cre recombinase et 1.5 μ l de tampon concentré 10x (500 mM Tris-HCl pH 7.5, MgCl₂ 100 mM, NaCl 300 mM, BSA 1mg/ml). Le volume est complété à 15 μ l par de l'eau double distillée. La réaction est incubée 30 min à température ambiante, suivi de 30 min à 37°C. La réaction est ensuite stoppée par chauffage à 65°C durant 5 min. La totalité de la réaction est utilisée pour transformer des cellules *E. coli* Top10 et XL1 blue chimiquement compétentes. La sélection des clones d'intérêt est effectuée sur milieu LB contenant de la kanamycine (50 μ g/ml).

2.2.5 Surexpression et purification des septines

10 ml d'une culture sur la nuit de *E. coli* Top10 portant les plasmides pFM129 (Unc61-GST) ou pFM193 (Unc59-GST) sont dilués dans 1l de LB/kanamycine (50 μ g/ml) et incubés à 37°C en rotation 200 rpm. La croissance de la culture est monitorée et à OD₆₀₀ de 0.8, on y ajoute de l'IPTG pour une concentration finale de 0.5 mM. La culture est alors incubée à 18°C sur la nuit. Les cellules sont collectées par centrifugation à 4000 rpm durant 15 min puis resuspendues dans 50 ml de tampon A

(Tris-HCl pH 7.4 50 mM, NaCl 50 mM, Tris-EDTA 1 mM, glycérol 5%, complexe d'inhibiteurs de protéases), plus 25 mg de lysozyme suivi de 30 min d'incubation à température ambiante. Les cellules ont été lysées par 5 cycles de 30 secondes de sonication sur la glace puis centrifugées durant 40 min à 40'000 rpm à 4°C. Le culot est resuspendu dans 10 ml de tampon A et solubilisé avec 1% de DOC durant une incubation de 20 min suivi de 10 min de centrifugation à 40'000 rpm. Ce nouveau culot est à son tour resuspendu dans 10 ml de tampon A et solubilisé avec 0.5% de SLS et centrifugé comme précédemment. Le culot final est resuspendu dans 10 ml de tampon A et additionné de SLS pour une concentration finale de 2% et des aliquotes de 5 ml ont été congelés à -20°C.

2.2.6 Liaison des septines à la matrice de Sepharose

400 µl de billes Glutathione Sepharose 4B en suspension à 75% ont été lavés 2 fois avec 1 ml de tampon A et centrifugation de 5 min à 500 rpm. Après la dernière centrifugation de lavage, les billes décantées ont été resuspendues pour être lavées dans 10 ml de tampon B froid (Tris-HCl pH 7.4 50 mM, NaCl 50 mM). Après centrifugation les billes sont reprises dans le tampon B pour une suspension finale de 50%.

1.5 ml de protéines congelées à l'étape précédente sont ajoutés à la suspension de billes avec un mélange d'inhibiteurs de protéases. L'ensemble est incubé 10 min à 4°C. Les billes sont ensuite lavées 5 fois avec le double de volume de tampon B sur glace. Les billes chargées de protéines (GST-unc59 ou GST-unc61) sont conservées congelées à -20°C.

2.2.7 Sélection des anticorps par *phage display*

Pour la sélection des formes sans nucléotides 250 µl de EDTA 0.05 M sont ajoutés à 250 µl de billes-protéines préparées précédemment suivi d'une incubation de 15min à température ambiante.

Pour sélectionner les phages présentant des anticorps spécifiques contre les septines contenant un nucléotide, à 250 µl de billes-protéines sont ajoutés 250 µl de MgCl₂ à 1M puis 10 µl de GDP ou GTPγS à 50 mM et le mélange est incubé à 30°C durant 20 min.

Dans les 2 cas, aux billes-protéines sont ajouté 200 µl de TBS avec 10% de lait. Aux mélanges sont ajouté 500 µl de préparation de phages de la banque ETH-2 ayant été

incubés sur billes-GST 1h à température ambiante (TA) et récupérés après 2 min de centrifugation à 500 rpm. Les mélanges sont incubés 30 min sur une roue en rotation lente puis laisser reposer 1h à température ambiante. Les billes sont ensuite lavées 3 fois par centrifugation/resuspension avec 1 ml de tampon TBS et resuspension dans 1 ml de tampon TBS.

L'élution est faite par 2 passages de 500 μ l de tampon glutathionne 20 mM, Tris-HCl pH 8.8, incubation à température ambiante et rotation durant 30 min, suivi de 2 min de centrifugation à 2000 rpm.

Les surnageants de 500 μ l contenant les phages anticorps liés aux protéines cibles sont utilisés pour infecter 10 ml de culture de *E. coli* TG1 en phase exponentielle dans du milieu 2xTY durant 1h à 37°C. La culture est alors centrifugée 15 min à 3000 rpm. Le culot de cellules est resuspendu dans 250 μ l de milieu 2xTY etensemencé sur des boites de 2xTY ampicilline (100 μ g/ml) pour une croissance sur la nuit à 30°C.

2.2.8 Préparation des phages après sélection

Tous les clones des boites de sélection 2xTY ampicilline sont collectés ensemble dans 20 ml de 2xTY ampicilline. 3 à 5 ml de ce mélange est utilisé pour inoculer 200 ml de 2xTY ampicillin. La culture est incubée à 37°C avec agitation de 200 rpm jusqu'à une densité OD₆₀₀ de 0.5 et infectée par le phage auxiliaire selon un titre final de 10⁹ tu/ml durant 1h à 37°C. Les cellules sont collectées par 10 min de centrifugation à 3000 rpm.

Les cellules sont lysées par resuspension douce dans 500 μ l de 2xTY ampicilline (100 μ g/ml) kanamycine (50 μ g/ml) et environ 36h d'incubation à TA. La suspension est alors centrifugée 10 min à 8000 rpm et le surnageant immédiatement précipité par addition de 500 ml d'un tampon PEG/NaCl (PEG 20%, NaCl 2.5 M) et 1h d'incubation sur glace. Après 30 min de centrifugation à 8000 rpm, le culot est resuspendu dans 65 ml d'eau double distillée plus 0.2 volume de PEG/NaCl et une incubation de 20 min sur la glace. Le précipitât est collecté par 30 min de centrifugation à 8000 rpm. Après aspiration du surnageant, le culot est centrifugé 5 min à 5000 rpm avant d'être resuspendu dans 2 ml de tampon PBS. Une dernière centrifugation à 4500 rpm durant 10 min permet d'éliminer les débris cellulaires restant. Le surnageant est aliquoté en fractions de 500 μ l conservées à -80°C.

2.2.9 ELISA

Les microplaques 96 puits sont stérilisées sous UV durant au moins 2h.

Les puits d'une microplaque sont couverts de 250 μ l de tampon TBS 2% de lait durant 2h à 37°C. Après 2 lavages avec 200 μ l de PBS, 200 μ l de milieu 2xTY ampicilline sont déposés dans chaque puit. Un clone TG1/phage est inoculé par puit et incubé au moins 3h à 37°C. Ensuite, 25 μ l de milieu 2xTY ampicilline contenant 10^9 phages auxiliaires sont ajoutés à chaque puit. Après 1h d'infection à 37°C, la microplaque est centrifugée 15 min à 5000 rpm et le surnageant de chaque puit est aspiré. Chaque pellet est alors resuspendu dans 200 μ l de 2xTY ampicilline. La plaque est incubée sur la nuit à 37 °C.

En parallèle, les puits de 3 autres plaques sont couverts de de 100 μ l d'anticorps anti-GST dilué 1:1800 dans du TBS. Les microplaques sont incubées à 4°C durant 24h, puis lavées 2 fois avec 200 μ l TBS puis chaque puit est bloqué avec 200 μ l de TBS contenant 3% de lait durant 2h à 37°C.

Les solutions protéines/nucléotides sont préparées en parallèle dans 1.5 ml de TBS en y ajoutant selon les cas : sans nucléotide 30 μ l EDTA 0.5 mM, GDP 0.25 mg, GTP γ S 0.2 mg, dans tous les cas 1 μ l de protéine purifiée GST-unc59 ou GST-unc61, et incubé 20 min à 37°C. 20 μ l de MgCl₂ à 1 M est ajouté aux 2 fractions contenant des nucléotides.

Les microplaques avec les anticorps anti GST sont lavées 2 fois avec 200 μ l de TBS par puit suivi d'un dépôt de 100 μ l de tampon A ou 100 μ l de tampon EDTA dans le cas de « sans nucléotide » par puit. 100 μ l des solutions protéiques avec ou sans nucléotides sont ajoutés aux puits et les plaques sont incubées 1h à température ambiante. Les microplaques sont lavées 2 fois avec le tampon A ou le tampon TBS-EDTA. Chaque puit est bloqué avec 100 μ l de 4% de lait dans le tampon A ou TBS-EDTA plus 100 μ l de surnageant de culture de la plaque de culture des clones de phages isolés après 15 min de centrifugation à 3000 rpm. Les plaques sont incubées 1h à température ambiante.

Les puits des microplaques sont lavées 2 fois avec 200 μ l de tampon A ou TBS-EDTA. Puis 200 μ l d'anticorps anti M13 conjugué au HRP dilué 1:2500 fois dans le tampon A ou TBS-EDTA contenant 2% de lait sont ajouté avant 1h d'incubation à

température ambiante. Les microplaques sont lavées 2 fois comme précédemment et 100 µl d'une solution de substrat ABTS (1.05 g acide citrique, pH ajusté à 4 avec une solution 1M NaOH, 22 mg de ABTS, 90 µl H₂O₂ à 30%) sont déposés dans chaque puit. Les microplaques sont incubées 30 à 60 min à température ambiante avant la lecture colorimétrique à 405 nm.

2.2.10 Le double hybride

Les fusions entre le domaine d'activation GAL4 (AD) et les ADNc des protéines d'intérêt ont été construits en utilisant le vecteur pACT2lox et les clones d'ADNc de pUNI. Ces constructions ont été transformées en même temps que les fusions BD avec les clones d'anticorps recombinants dans la lignée de levure HF7C en sélectionnant la croissance sur un milieu synthétique de levure dépourvu de trp, leu ou double trp-leu selon la/les constructions de transformation. Les interactions des fusions BD et AD ont été testées après une nuit d'incubation sur des plaques de milieu synthétique de levure dépourvus d'histidine et d'adenine et contenant 80 mg/l de X-Gal pour dépister les clones bleus ayant activé les gènes rapporteurs HIS3 et ADE2.

2.3 Résultats

2.3.1 Isolement et caractérisation d'anticorps recombinants anti-Cdc12 de *S. cerevisiae*, anti-Unc-59 et anti-Unc-61 de *C. elegans*

Les phages recombinants produits à partir de la banque ETH2 ont, dans un premier temps, été sélectionnés contre les protéines GST-Cdc12, GST-Unc-59 ou GST-Unc-61 fixées sur des billes de glutathion par l'étiquette GST, en présence ou non de nucléotides GDP et GTPγS, forme non hydrolysable de GTP.

Les phages élués suite à la première sélection et ré-amplifiés ont d'abord été incubés sur des billes recouvertes de GST pour éliminer les phages reconnaissant la GST. Puis, le surnageant a été incubé avec les billes recouvertes de GST-Cdc12, GST-UNC-59 ou GST-UNC-61. Ce tour de sélection, composé de 2 sélections successives et reproduit 3 fois, a permis de sélectionner les phages reconnaissant la protéine GST-Cdc12, GST-Unc-59 ou GST-UNC-61 (Figure 30).

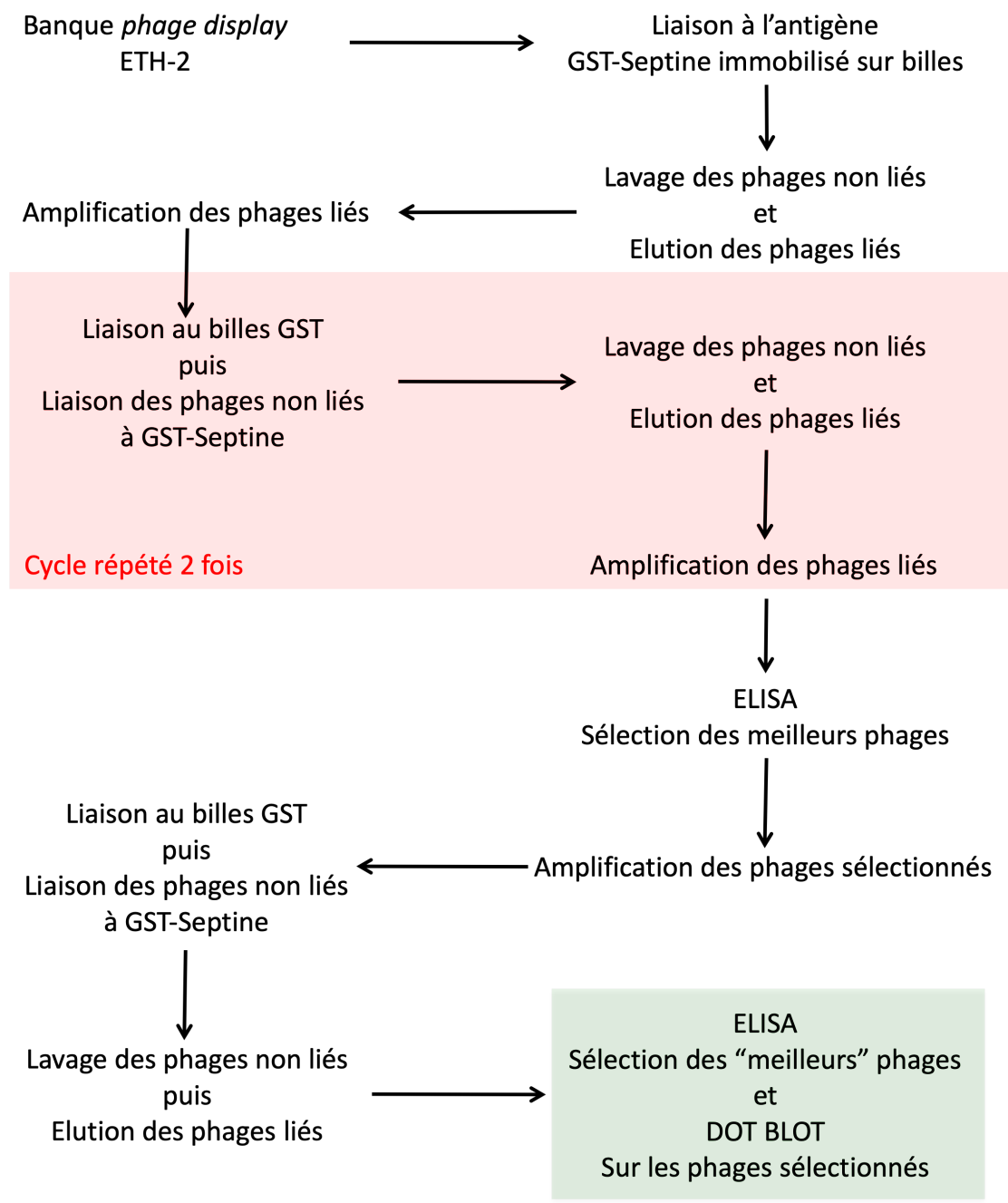


Figure 30 : Protocole suivi pour la sélection de phages spécifiques de la protéine Cdc12, Unc-59 ou Unc-61.

2.3.2 Recherche de clones spécifiques par tests ELISA

Après les tours de sélection, nous avons effectué une étape de criblage avec un test ELISA sur les clones de phages sélectionnés selon le protocole détaillé dans la section « matériels et méthodes ». Un total de 138 clones, contre les différentes formes de septines GDP ou GTPγS liés, ont été testés sur des plaques ELISA recouvertes de protéines GST, GST-Cdc12, GST-Unc-59 ou GST-Unc-61, en présence ou non de GDP ou GTPγS. Une fraction de la suspension de phages sélectionnés a été incubée dans ces

puits. Les phages non fixés ont été éliminés par lavage et un anticorps spécifique de la capsid du phage, anti-M13 marqué par la HRP, *horseradish peroxidase*, a été ajouté dans les puits (Figure 31). Grâce à la coloration des puits suite à la réaction de la peroxydase et la mesure de l'absorption optique obtenue, nous avons comparé les quantités de phages fixés dans chacun des puits. Pour chaque forme de septines nous avons retenu 23 clones qui ont donné des signaux positifs de liaison sur leur protéine cible en ELISA.

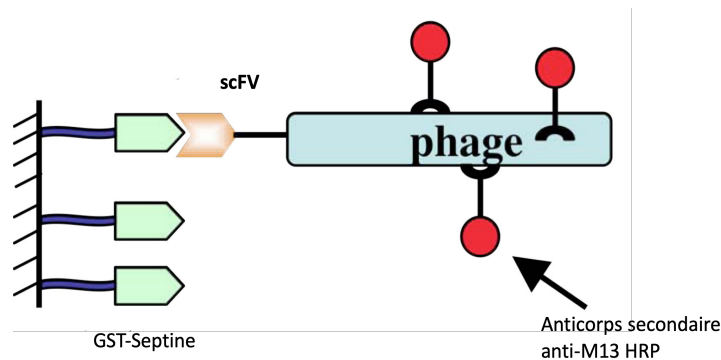


Figure 31 : Représentation schématique d'un ELISA sur puits de plaques ELISA.

Les protéines GST-Cdc12, GST-Unc-59 ou GST-Unc-61 sont fixées par l'étiquette GST dans les puits recouverts de glutathion des plaques ELISA. Les phages sont ajoutés dans les puits et ceux qui sont spécifiques de la cible se fixent sur la septine correspondante par le scFv exprimé à la surface du phage. Les phages fixés sont détectés par un anticorps anti-M13, spécifique d'une protéine de la capsid du phage, et couplé à la peroxydase de Raifort.

2.3.3 Evaluation de la spécificité des anticorps recombinants isolés par le test dot blot

Afin de contrôler la spécificité de ces clones, nous avons comparé leur fixation sur les protéines GST, GST-Cdc12, GST-Unc-59 et GST-Unc-61, avec GDP ou GTP γ S en dot blot. Nous avons fixé les protéines GST-Cdc12, GST-Unc-59 et GST-Unc-61 sur une membrane PVDF, *polyvinylidenfluorid*, sans électrophorèse préalable selon une dilution séquentielle jusqu'à 1/50. La détection a été réalisée par utilisation d'un anticorps secondaire anti-M13-HRP.

Les séries de sélection et de criblage préalable ont abouti à l'isolement de deux anticorps anti-Cdc12, un anticorps anti-Unc-59 et un anticorps anti-Unc-61 très spécifiques qui ont été testés sur dot blot.

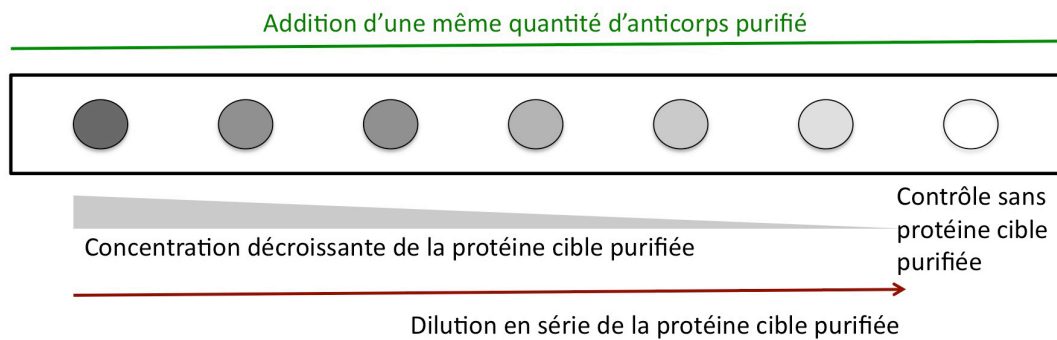


Figure 32 : Représentation schématique d'un dot blot.

L'anticorps anti-Cdc12 montre un signal jusqu'à une dilution de 1/20 de la protéine GST-Cdc12. Anti-Unc-61 montre un résultat positif jusqu'à une dilution de 1/50 de GST-Unc-61. Les anticorps anti-Cdc12 et anti-Unc-61 ne donnent aucun signal sur les contrôles GST. L'anticorps anti-Unc-59 n'a pas été analysé par dot blot et n'a pas été utilisé dans la suite du projet.

2.3.4 Etude *in vivo* de l'anticorps anti unc-61^{GDP} – isolement d'un *intrabody*

Afin de vérifier l'interaction des anticorps recombinants anti-Cdc12 et anti-Unc-61 isolés *in vitro* avec leur protéine cible *in vivo* en condition réductrice du cytoplasme, chez *S. cerevisiae*, nous avons utilisé la méthode du double hybride.

Le double hybride est une méthode fiable et relativement rapide de détection des interactions protéine-protéine. Basée sur la modularité des facteurs de transcription eucaryotes, le double hybride repose sur l'activation d'un gène rapporteur en réponse à l'interaction de 2 protéines recombinantes. Dans le cas de l'hôte *S. cerevisiae*, chaque protéine est produite fusionnée à un module de l'activateur transcriptionnel GAL4. Les deux parties de GAL4 sont réunies grâce à l'interaction des protéines exogènes, et la cascade enzymatique permettant l'utilisation du glucose vont induire la croissance de la levure sur le milieu sélectif adéquat (Figure 32).

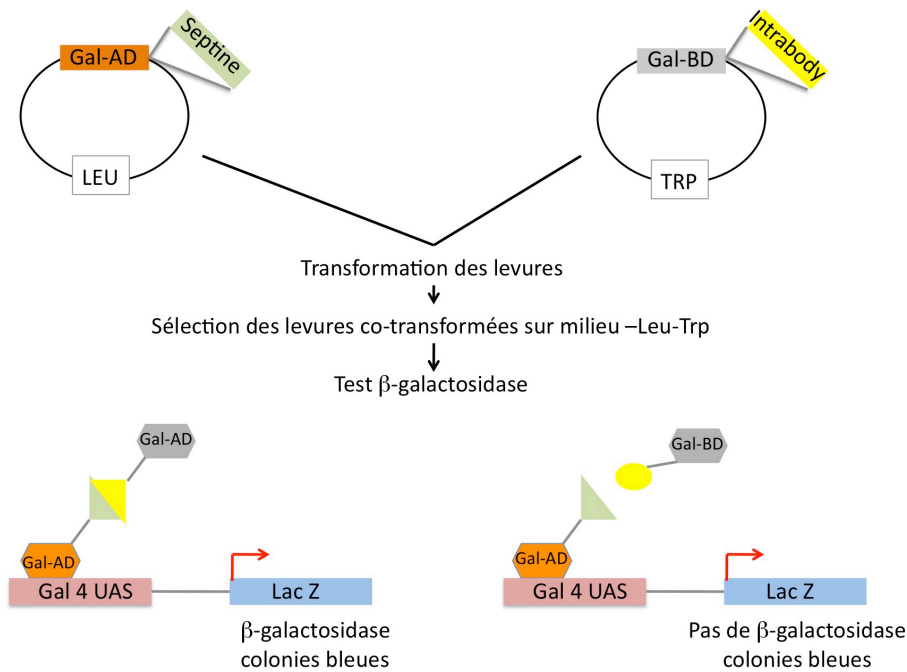


Figure 33 : Principe du double hybrides. D'après Field et Song, 1989.

Nous avons amplifié par PCR les séquences scFv des clones d'anticorps ayant répondu avec la plus grande dilution en dot blot. Ces fragments d'ADN ont été clonés dans un des vecteurs d'expression double hybride inducible. Le second vecteur a reçu soit le gène Cdc12 ou Unc-61. L'interaction septine/anticorps a été visualisée par la coloration bleue des colonies de *S. cerevisiae* transformé sur milieu sélectif après induction de l'expression des protéines hybrides et interactions septine/anticorps.

Les résultats positifs des essais double hybride ont démontré l'isolement d'intrabodies car les fragments d'anticorps recombinants reconnaissent leur antigène *in vivo*.

Nous avons donc étudié l'impact de l'expression intracellulaire des anticorps recombinants anti-Cdc12 et anti-Unc-61 positifs en double hybrides, sur la localisation des septines et la formation d'anneau de septines au col du bourgeon. Une étude préalable (non publiée) avait montré que l'expression simultanée de UNC-59 et UNC-61 complétait en partie la perte de l'anneau de septines au col du bourgeon chez le mutant *cdc12-6* placé à température restrictive.

L'anticorps anti-Unc-61^{GDP} a été cloné dans un vecteur d'expression inducible de la levure et a été transformé dans un mutant conditionnel *cdc12-6* portant un vecteur

d'expression pour GFP-Unc61 pour la visualisation en microscopie à fluorescence de l'anneau de septines au col du bourgeon.

Une première série de contrôles montre que lorsque les mutants *cdc12-6* sont placés à température restrictive, avec induction de l'expression de UNC59 et UNC61, la perte de fluorescence au cou des bourgeons est complétée à plus de 90 % (Figure 34, 1-2). Lorsque l'expression de l'anticorps anti-Unc-61 est induite dans les mêmes conditions la présence des septines de *C. elegans* au col du bourgeon chez le mutant n'est complétée que de 30 % environ (Figure 34, 3-4).

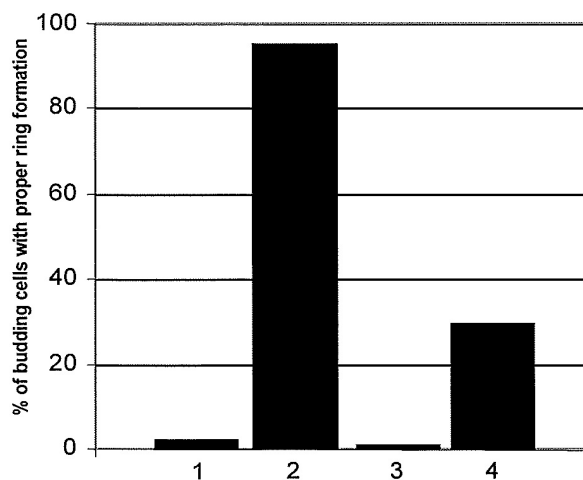


Figure 34 : Nombre de cellules *S. cerevisiae cdc12-6* à température restrictive avec un anneau de septines correctement formé au col du bourgeon.

(1) GFP-Unc-59 + Unc-61 sur glucose (sans induction), **(2)** GFP-Unc-59 + Unc-61 sur galactose (avec induction), **(3)** GFP-Unc-59 + Unc-61 + Anti-Unc-61 sur glucose (sans induction), **(4)** GFP-Unc-59 + Unc-61 + Anti-Unc-61 sur galactose (avec induction). D'après Faty et Thali, 2002.

2.4 Conclusion

Nous avons pu démontrer la possibilité d'isoler des *intrabodies* à partir d'anticorps recombinants spécifiquement dirigés contre les septines de *S. cerevisiae* et de *C. elegans* à partir de la banque ETH-2. De plus, ces *intrabodies* sont capables de perturber la formation d'anneau de septines au col du bourgeon chez *S. cerevisiae*.

Malgré l'interruption du projet à ce stade, nous avons pu démontrer la possibilité d'obtenir un outil de dissection de la fonction des septines *in vivo* dans des cellules sauvages de *S. cerevisiae*. Des ajustements et des mises au point des techniques d'amplification de la banque ETH-2, des clones de phages sélectionnés ainsi que l'automatisation permettant de travailler sur une gamme plus large de

sélection/criblage devrait grandement faciliter l'isolement de plusieurs *intrabodies* et l'étude plus approfondie de la fonction des septines *in vivo* sans avoir à recourir à des cellules mutantes.

1 Les septines, la quatrième composante du cytosquelette

Tous les éléments du cytosquelette sont des structures protéiques allongées, organisées en réseaux, faisceaux ou câbles qui résultent de la polymérisation d'éléments monomériques, suivant les rôles qu'ils remplissent [Chabadel *et al.*, 2007]. Tout au long du cycle cellulaire, en réponse à des signaux spécifiques, ces composants dynamiques et polarisés se réorganisent continuellement en réseaux élaborés de filaments dans le cytoplasme et sur la face interne du cortex cellulaire.

Les informations structurelles sur les différents niveaux d'organisation des septines ont apporté de précieuses informations sur les fonctions moléculaires des septines [S. Mostowy *et al.*, 2012]. Les septines, omniprésentes et liant le GTP, sont capables de s'associer en complexe annulaire, ou septum, au niveau de la zone de séparation de la cellule mère et du bourgeon, et de former des anneaux et des réseaux servant de support pour de nombreux facteurs de la polarité cellulaire et de la cytocinèse. Les septines peuvent, pour cette raison, être considérées comme formant une quatrième composante du cytosquelette, dont les filaments ont un diamètre de 7 à 10 nm et une longueur de 32 à 100 nm [Frazier *et al.*, 1998].

Les différentes molécules de septines d'une cellule n'ont pas des rôles équivalents au sein des complexes qu'elles forment. Dans chaque cas, une paire de septines s'organise en un noyau tétramérique dans le complexe [Versele *et al.*, 2005]. Chez la levure *S. cerevisiae*, seules deux des cinq septines mitotiques, Cdc3 et Cdc12, sont essentielles pour la croissance végétative, ce qui suggère qu'elles sont cruciales pour l'assemblage du complexe de septines. Malgré la variation observée entre divers complexes de septines, l'organisation moléculaire de leur noyau est un hétérotétramère conservé.

Les septines de *C. elegans*, UNC-59 et UNC-61, qui sont orthologues à Cdc3 et Cdc12, représentent une sous-unité minimale de septines. Ces deux septines sont nécessaires et suffisantes pour la formation de structures d'ordre supérieur et de filaments dans les cellules de *S. cerevisiae* et ceux-ci sont fonctionnellement similaires à l'assemblage de septines de *S. cerevisiae*. Nous avons montré que UNC-59 et UNC-61 s'assemble en hétérodimères qui à leur tour forment des complexes hétérotétramériques capables de s'associer en structures d'ordre supérieur et en

filaments. Les études en ME montrent que l'hétérotétramère UNC-59/UNC-61 est une structure allongée en forme de tige composée de deux sous-unités centrales UNC-61 flanquées de deux sous-unités UNC-59 et que les superhélices hélicoïdales de UNC-59/UNC-61 s'étendent latéralement de l'hétérotétramère.

Notre modèle du complexe élémentaire de septines est compatible avec les données génétiques et protéomiques rapportées pour les complexes de septines de *S. cerevisiae* [Versele *et al.*, 2004; Farkasovsky *et al.*, 2005]. Les deux septines essentielles Cdc3 et Cdc12 forment un noyau tétramérique résistant aux protéases dans les complexes nonamériques.

Par analogie avec l'actine et la tubuline, deux membres très étudiés du cytosquelette, la liaison au nucléotide et la phosphorylation régulent les interactions protéine-protéine et la polymérisation des filaments requise pour l'assemblage des complexes de septine et de leurs fonctions.

Nos résultats sur l'organisation moléculaire des complexes de septines ont donc fourni une base moléculaire pour la compréhension de la formation des complexes de septines. Ces résultats suggèrent également un mécanisme pour la formation des autres structures d'ordre supérieur de septines présentant des surfaces polaires, y compris les feuilletts.

Nous suggérons que c'est la propriété des septines à s'assembler en filaments et structures paramembranaires, comme les autres membres du cytosquelette, qui joue un rôle important dans leur capacité à rester au cou des bourgeons où elles forment un échafaudage rigide [DeMarini *et al.*, 1997] qui marque et maintient la position du bourgeonnement axial par recrutement de protéines importantes pour la spécification du site de division, permettant la mise en place et le maintien de la machinerie de clivage à ce site.

Notre modèle prédit que la dynamique de polymérisation/dépolymérisation des septines doit être beaucoup plus lente que celle des autres composantes cytosquelettiques, notamment l'actine et la tubuline, permettant ainsi à l'anneau de septines d'organiser et de réguler la compartimentation du cortex cellulaire au niveau du col du bourgeon en agissant comme une barrière pour délimiter des compartiments locaux. En empêchant la diffusion latérale des facteurs associés à la membrane

plasmique entre la cellule mère et le bourgeon, les septines maintiennent et régulent la polarité cellulaire mère-bourgeon.

Au cours des dernières années, la majorité des résultats d'études publiés dans tous les domaines de la biologie des septines ont concernés la levure *S. cerevisiae*. Toutes ces études confirment la levure en tant qu'organisme modèle de choix pour la recherche sur les septines. L'utilisation d'organismes modèles simple comme *S. cerevisiae* et *C. elegans* est donc cruciale pour la compréhension des propriétés et des fonctions des septines car à mesure que davantage de septines seront examinées chez divers organismes et tissus, les différences entre les royaumes disparaîtront probablement [Beise *et al.*, 2011].

En plus de leur rôle initial dans la division cellulaire, les septines jouent un rôle dans la coordination de la division nucléaire, le trafic membranaire et l'organisation du cytosquelette. Étant donné que les septines de mammifères interagissent avec diverses molécules et sont essentielles dans de nombreux processus cellulaires, il n'est pas surprenant qu'elles soient impliquées dans de nombreuses maladies humaines et la tumorigenèse. L'engagement de nombreux groupes de recherche dans l'étude sur les septines ont aboutit, entre autres, à leur utilisation en diagnostique, servant de biomarqueur efficace par exemple dans la détection du cancer colorectal [Grutzmann *et al.*, 2008; Lofton-Day *et al.*, 2008]. Le rôle des septines dans d'autres troubles, comme celles neurologiques, reste complexe et peu compris [Peterson *et al.*, 2010] nécessite encore beaucoup d'efforts de recherche.

2 Applications des anticorps recombinants et des *intrabodies*

Le développement d'outils d'investigation moléculaire facilement manipulable reste un défi pour la recherche, le diagnostic et la thérapie modernes.

Nous avons pu démontrer la possibilité d'isoler des anticorps recombinants spécifiquement dirigés contre les septines de *S. cerevisiae* et de *C. elegans* à partir de la banque en *phage display* ETH-2. De plus, nous avons sélectionné, de ces anticorps recombinants, des *intrabodies* anti-septines, dirigés contre leur protéine cible et capable d'inhiber leur fonction et obtenir ainsi un outil d'élucidation de la fonction des septines *in vivo* sans avoir recours à des mutants ou la surexpression protéique.

La puissance des *intrabodies* et anticorps recombinants en termes d'efficacité et de spécificité, alliée au vaste spectre de leurs applications potentielles, notamment pour perturber la fonction et suivre la dynamique des protéines endogènes et bloquer des protéines virales ou oncogéniques, laissent entrevoir pour ces anticorps des perspectives uniques que ce soit en recherche fondamentale ou en recherche appliquée. En terme d'immunisation intracellulaire, l'utilisation des *intrabodies* est confirmée en thérapie génique humaine et dans le ciblage de molécules thérapeutiques.

Une autre application très prometteuse des anticorps recombinants est leur utilisation dans les biopuces à anticorps, fonctionnelles et analytiques. Ces systèmes miniaturisés constituent un outil permettant d'étudier les interactions protéine/ligand avec un débit inatteignable par les méthodes classiques [Wingren *et al.*, 2008].

Avec l'augmentation du nombre et de la qualité des banques d'anticorps recombinants et le développement de l'automatisation, les anticorps souhaités seront isolés en quelques jours plutôt qu'en plusieurs semaines ou mois. On peut également envisager des sélections basées sur la fonction, par opposition aux sélections basées sur la liaison seule, telles que des anticorps de phage sélectionnés pour une internalisation, le déclenchement d'un récepteur ou une activité catalytique. Enfin, le domaine de la génomique fonctionnelle et l'approche d'anticorps intracellulaires devraient fournir des informations précieuses conduisant éventuellement à un ensemble de réactifs pharmaceutiques destinés à être utilisés comme molécules de ciblage et/ou de neutralisation.

Il serait donc pertinent, aujourd'hui, de reprendre le projet d'isolement d'anticorps recombinants et d'*intrabodies* anti septines.

A

- Adams AEM, Pringle JR (1984) *Relationship of actin and tubulin distribution to bud growth in wild-type and morphogenetic mutant Saccharomyces cerevisiae*. J. Cell Biol. 98:934-945.
- Adey NB, Mataragnon AH, Rider JE, Carter JM, Kay BK (1995) *Characterization of phage that bind plastic from phage-displayed random peptide libraries*. Gene ; 156 : 27-31.
- Alcántar-Fernández J, Navarro RE, Salazar-Martínez AM, Pérez-Andrade ME, Miranda-Ríos J (2018) *Caenorhabditis elegans respond to high-glucose diets through a network of stress-responsive transcription factors*. PLoS One. Jul 10;13(7).
- Amberg DC, Zahner JE, Muhlolland JW, Pringle JR, Botstein D (1997) *Aip3p/Bud6p, a yeast actin-interacting protein that is involved in morphogenesis and the selection of bipolar budding sites*. Mol Biol Cell 8:729–753.
- An H, Morrell JL, Jennings JL, Link AJ, Gould KL (2004) *Requirements of fission yeast septins for complex formation, localization, and function*. Mol Biol Cell 15: 5551–5564.
- Andrea L.J. Marschall a, Stefan Dübel (2016) *Antibodies inside of a cell can change its outside: Can intrabodies provide a new therapeutic paradigm?* Computational and Structural Biotechnology Journal 14 304–308.
- Andris-Widhopf J, Steinberger P, Fuller R, Rader C, Barbas CF (2011) *Generation of human scFv antibody libraries: PCR amplification and assembly of light- and heavy-chain coding sequences*. Cold Spring Harbor protocols, 2011(9).
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smth JA, Struhl K (eds). (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. Harvard Medical School, Boston: John Wiley and Sons.
- Avery L, (2011) *Sydney Brenner*. Southwestern Medical Center.
- Avril A (Thèse 2013) *Isolement de fragments d'anticorps recombinants neutralisant des toxines à partir de primates non humains et localisation de l'épitope d'un anticorps*. , Grenoble, France

B

- Barbas, C. F. III., (1993) *Recent advances in phage display*. Curr. Opin. Biotechnol., 4, 526-530.
- Barbas CF, Burton DR, Scott JK, Silverman G J (2001) *Phage Display: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ed. 10.12–10.15 New-York CSHL Press.
- Barderas R, Shochat S, Martinez-Torrecedrada J, Altschuh D, Meloen R, Ignacio CJ (2006) *A fast mutagenesis procedure to recover soluble and functional scFvs containing amber stop codons from synthetic and semisynthetic antibody libraries* Journal of immunological methods, 312(1-2), 182–9
- Barral Y, Parra M, Bidlingmaier S, Snyder M (1999) *Nim1-related kinases coordinate cell cycle progression with the organization of the peripheral cytoskeleton in yeast*. Genes Dev 13:176–187.
- Barral Y, Mermall V, Mooseker MS, Snyder M (2000) *Compartmentalization of the cell cortex by septins is required for maintenance of cell polarity in yeast*. Mol Cell 5:841–851.

- Beites CL, Xie H, Bowser R, Trimble WS (1999) *The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis*. Nat Neurosci 2: 434–439.
- Beh CT, Rine J (2004) *A role for yeast oxysterol-binding protein homologs in endocytosis and in the maintenance of intracellular sterol-lipid distribution*. J Cell Sci. 117(Pt 14): 2983-96.
- Beise N, Trimble W (2011) *Septins at a glance*. Journal of Cell Science.
- Berger I, Fitzgerald DJ, Richmond TJ (2004) *Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes*. Nat Biotechnol 22: 1583–1587.
- Berger P, Schaffitzel C, Berger I, Ban N, Suter U (2003) *Membrane association of myotubularin-related protein 2 is mediated by a pleckstrin homology-GRAM domain and a coiled-coil dimerization module*. Proc Natl Acad Sci USA 100: 12177–12182.
- Better M, Chang, CP, Robinson RR, Horwitz, AH (1988) *Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment*. Science 240(4855), 1041–3
- Bi E, Maddox P, Lew DJ, Salmon ED, McMillan JN, Yeh E, Pringle JR (1998) *Involvement of an actomyosin contractile ring in Saccharomyces cerevisiae cytokinesis*. J Cell Biol 142:1301–1312.
- Biocca S, Ruberti F, Tafani M, Pierandrei-Amaldi P, Cattaneo A (1995) *Redox state of single chain Fv fragments targeted to the endoplasmic reticulum, cytosol and mitochondria*. Biotechnology (N Y) 13(10):1110–5.
- Biocca S, Pierandrei-Amaldi P, Campioni N, Cattaneo A (1994) *Intracellular immunization with cytosolic recombinant antibodies*. Biotechnology 12, 396 – 399.
- Blose SH, Meltzer DI, Feramisco JR (1984) *10-nm filaments are induced to collapse in living cells microinjected with monoclonal and polyclonal antibodies against tubulin*. J Cell Biol 98(3):847–58.
- Borkhardt A, Teigler-Schlegel A, Fuchs U, Keller C, König M, Jochen Harbott J, Haas OA (2001) *An ins(X;11)(q24;q23) fuses the MLL and the Septin 6/KIAA0128 gene in an infant with AML-M2*. Genes Chromosomes 32(1):82-8.
- Burritt JB, Bond CW, Doss KW, Jesaitis AJ. *Filamentous phage display of oligopeptide libraries*. Anal Biochem 1996 ; 238 : 1-13.
- Buss NA, Henderson SJ, McFarlane M, Shenton JM, de Haan L (2012) *Monoclonal antibody therapeutics: history and future*. Curr Opin Pharmacol 12:615–622.
- Brack SS, Silacci M, Birchler M, Neri D (2006) *Tumor-targeting properties of novel antibodies specific to the large isoform of tenascin-C*. Clin Cancer Res 12: 3200–3208.
- Brandenberger R, Kammerer RA, Engel J, Chiquet M (1996) *Native chick laminin-4 containing the beta 2 chain (s-laminin) promotes motor axon growth*. J Cell Biol 135: 1583–1592.
- Brenner S (1974) *The genetics of Caenorhabditis elegans*. Genetics. 77 (1): 71–94.
- Byers B, Goetsch L (1976) *A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast*. J Cell Biol 69:717–721.

C

- Carlos F, Barbas III (1993) *Synthetic human neutralizing monoclonal antibodies to human immunodeficiency virus*. J. Mol. Biol., 230, 812-823.

- Carroll CW, Altman R, Schieltz D, Yates JR, Kellogg D (1998) *The septins are required for the mitosis-specific activation of the Gin4 kinase*. J Cell Biol 143:709–717.
- Caudron F. (2009) *Une barrière de diffusion permet la jouvence de la levure*. Med Sci (Paris) 25 : 217–218.
- Cardinale A, Filesi I, Singh PB, Biocca S (2015) *Intrabody-mediated diverting of HP1beta to the cytoplasm induces co-aggregation of H3-H4 histones and lamin-B receptor*. Exp Cell Res 338(1):70–81.
- Cerveira N, Correia C, Bizarro S, Pinto C, Lisboa S, Mariz JM, Marques M, Teixeira MR (2006) *SEPT2 is a new fusion partner of MLL in acute myeloid leukemia with t(2;11)(q37;q23)*. Oncogenomics 25, 6147–6152.
- Chabadel A. (2007) *Structures, stabilité et fonctions du cytosquelette d'actine dans les ostéoclastes matures*. ENS Lyon, France
- Chahboun S, Hust M, Liu Y, Pelat T, Miethe S, Helmsing S, Jones RG (2011) *Isolation of a nanomolar scFv inhibiting the endopeptidase activity of botulinum toxin A, by single-round panning of an immune phage-displayed library of macaque origin*. BMC biotechnology, 11, 113.
- Chen YT, Old LJ (1999) *Cancer-testis antigens: Targets for cancer immunotherapy*. Cancer J Sci Am, 5, 16-17.
- Chenevert J, Valtz N, Herskowitz I (1994) *Identification of genes required for normal pheromone-induced cell polarization in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 136:1287–1296.
- Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G (1991) *Making antibody fragments using phage display libraries*. Nature 352: 624–628.
- Cooper JA, Kiehart DP (1996) *Septins may form a ubiquitous family of cytoskeletal filaments*. J Cell Biol 134:1345–1348.

D

- DeMarini DJ, Adams AE, Fares H, De Virgilio C, Valle G, Chuang JS, Pringle JR (1997) *A septin-based hierarchy of proteins required for localized deposition of chitin in the Saccharomyces cerevisiae cell wall*. J Cell Biol 139:75–93.
- Desplancq D, Freund G, Conic S, Sibling AP, Didier P, Stoessel A (2016) *Targeting the replisome with transduced monoclonal antibodies triggers lethal DNA replication stress in cancer cells*. Exp Cell Res 342(2):145–58.
- Dragieva Z (Thèse 2016) *Caractérisation des structures de Septines hautement organisées chez la Drosophila et leur interaction avec le cytosquelette d'Actine*. Montréal, Canada
- Dobbelaere J, Gentry MS, Hallberg RL, Barral Y (2003) *Phosphorylation-dependent regulation of septin dynamics during the cell cycle*. Dev Cell 4: 345–357.
- Donini M, Morea V, Desiderio A, Pashkoulou D, Villani ME, Tramontano A (2003) *Engineering stable cytoplasmic intrabodies with designed specificity*. J Mol Biol 330(2):323–32.

E

- Entian KD, Schuster T, Hegemann JH, Becher D, Feldmann H, Guldener U, Gotz R, Hansen M,

- Hollenberg CP, Jansen G, *et al.*, (1999) *Functional analysis of 150 deletion mutants in Saccharomyces cerevisiae by a systematic approach*. Mol Gen Genet 262:683–702.
- Epp JA, Chant J (1997) *An IQGAP-related protein controls actinring formation and cytokinesis in yeast*. Curr Biol 7:921–929.
- Erlich P (1957) *Immunology and Cancer Research*. Vol. 2 (Himmelweit F., Ed.), Pergamon Press, Oxford.
- Evangelista M, Blundell K, Longtine MS, Chow CJ, Adames N, Pringle JR, Peter M, Boone C (1997) *Bni1p, a yeast forming linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis*. Science 276:118–122.
- Evangelista M, Pruyne D, Amberg DC, Boone C, Bretscher A (2002) *Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast*. Nat Cell Biol 4:32–41.
- Even-Desrumeaux K (Thèse 2012) Développement d'outils innovants pour le diagnostic et la découverte de cibles dans le cancer du sein. Aix-Marseille, France
- Ewert S, Huber T (2003) *Biophysical properties of human antibody variable domains*. J Mol Biol 325(3): 531-53.
- F**
- Falciani C, Lozzi L, Pini A, Bracci L (2005) *Bioactive peptides from libraries*. Chem Biol 12 : 417-26.
- Farkasovsky M, Herter P, Voss B, Wittinghofer A (2005) *Nucleotide binding and filament assembly of recombinant yeast septin complexes*. Biol Chem 386: 643–656.
- Fares H, Peifer M, Pringle JR (1995) *Localization and possible functions of Drosophila septins*. Mol Biol Cell 6:1843–1859.
- Fares H, GoetschL, Pringle JR (1996) *Identification of a developmentally regulated septin and involvement of the septins in spore formation in Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Biol 132:399–411.
- Faty M, Fink M, Barral Y (2002) *Septins: a ring to part mother and daughter*. Curr Genet 41: 123–131.
- Field CM, Kellogg D (1999) *Septins: cytoskeletal polymers or signaling GTPases?* Trends Cell Biol 9:387–394.
- Field C, al-Awar O, Rosenblatt J, Wong M, Alberts B, Mitchison T (1996) *A purified Drosophila septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity*. J Cell Biol 133:605–616.
- Fijak M, Meinhardt A (2006) *The testis in immune privilege*. Immunol Rev, 213, 66-81.
- Finger FP, Kopish KR, White JG (2003) *A role for septins in cellular and axonal migration in C. elegans*. Dev Biol 261: 220–234.
- Finger FP, Novick P (1997) *Sec3p is involved in secretion and morphogenesis in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell 8:647–662.
- Finger FP, Novick P (1998) *Spatial regulation of exocytosis: lessons from yeast*. J Cell Biol 142:609–612.
- Fitzgerald DJ, DeLuca C, Berger I, Gaillard H, Sigrist R, Schimmele K, Richmond TJ (2004)

Reaction cycle of the yeast Isw2 chromatin remodeling complex. EMBO J 23: 3836–3843.

Flescher EG, Madden K, Snyder M (1993) *Components required for cytokinesis are important for bud site selection in yeast.* J Cell Biol 122:373–386.

Frank J, Radermacher M, Penczek P, Zhu J, Li Y, Ladjadj M, Leith A (1996) *SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields.* J Struct Biol 116: 190–199.

Frazier JA, Wong ML, Longtine MS, Pringle JR, Mann M, Mitchison TJ, Field C (1998) *Polymerization of purified yeast septins: evidence that organized filament arrays may not be required for septin function.* J Cell Biol 143:737–749.

Freund G, Sibling AP, Desplancq D, Oulad-Abdelghani M, Vigneron M, Gannon J (2013) *Targeting endogenous nuclear antigens by electrotransfer of monoclonal antibodies in living cells.* MAbs 5(4):518–22.

Froidevaux-Klipfel L (Thèse 2012) *Implication des septines recrutées sur les microtubules tyrosinés et polyglutamylés dans la résistance au taxol de cellules cancéreuses mammaires.* Paris-Sud, France

G

Giot L, Konopka JB (1997) *Functional analysis of the interaction between Afr1p and the Cdc12p septin, two proteins involved in pheromone-induced morphogenesis.* Mol Biol Cell 8:987–998.

Gladfelter AS, Pringle JR, Lew DJ (2001) *The septin cortex at the yeast mother-bud neck.* Curr Opin Microbiol 4:681–689.

Gladfelter AS, Kozubowski L, Zyla TR, Lew DJ (2005) *Interplay between septin organization, cell cycle and cell shape in yeast.* Journal of Cell Science 118, 1617.

Gottfried Y, Rotem A, Lotan R, Steller H, Larisch S (2004) *The mitochondrial ARTS protein promotes apoptosis through targeting XIAP.* EMBO J 23: 1627–1635.

Goubet AG, Derosa L, Marabelle A, Zitvogel L (2018) *Anticorps monoclonaux en oncologie : déclencher une réponse immunitaire en plus de la réduction tumorale spécifique.* Bull. Acad. Natle Méd. 202, n°34, 707-735.

Griffiths AD, Malmqvist M, Marks JD, Bye JM, Embleton MJ, McCafferty J, Baier M, Holliger KP, Gorick BD, Hughes-Jones NC (1993) *Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries.* EMBO. J., 12, 725-734 .

Griffiths AD, Williams SC, Hartley O, ITomlinson M, Waterhouse P, Crosby WL, Kontermann RE, Jones PT, Low NM, Allison TJ (1994) *Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires.* EMBO. J., 13, 3245-3260.

Grützmann R, Molnar B, Pilarsky C, Habermann JK, Schlag PM, Saeger HD, Miehle S, Stolz T, Model F, Uwe J, Roblick, Bruch HP, Koch R, Liebenberg V, Lofton-Day C (2008) *Sensitive Detection of Colorectal Cancer in Peripheral Blood by Septin 9 DNA Methylation Assay.* PLoS One 3(11).

H

Haarer BK, Pringle JR (1987) *Immunofluorescence localization of the Saccharomyces cerevisiae*

CDC12 gene product to the vicinity of the 10-nm filaments in the mother-bud neck. Mol Cell Biol 7:3678–3687.

Hannibal MC, Ruzzo EK, Miller LR, Betz B, Buchan JG, Knutzen DM, Barnett K, Landsverk ML, Brice A, LeGuern E, Bedford HM, Worrall BB, Lovitt S, Appel SH, Andermann E, Bird TD, Chance PF (2009) *SEPT9 gene sequencing analysis reveals recurrent mutations in hereditary neuralgic amyotrophy.* Neurology. 19;72(20):1755-9.

Harbury PB, Zhang T, Kim PS, Alber T (1993) *A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants.* Science 262: 1401–1407.

Hartwell LH (1971) *Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis.* Exp Cell Res 69:265–276.

Hartwell L, Culotti J, Reid B (1970) *Genetic control of the cell division cycle in yeast. I. Detection of mutants.* Proc Natl Acad Sci USA 66:352–359.

Hartwell LH, Culotti J, Pringle JR, Reid BJ (1974) *Genetic control of the cell division cycle in yeast.* Science 183:46–51.

Heyd B, Pecorari F, Collinet B, Adjadj E, Desmadril M, Minard P. *In vitro evolution of the binding specificity of neocarzinostatin, an enediynes-binding chromoprotein.* Biochemistry 2003 ; 42 : 5674-83.

Hoogenboom H, Winter G (1992) *By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro.* J. Mol. Biol., 227, 381-388 (1992).

Holliger P, Hudson PJ. *Engineered antibody fragments and the rise of single domains.* Nat Biotechnol 2005; 23 : 1126–36.

Honnappa S, John CM, Kostrewa D, Winkler FK, Steinmetz MO (2005) *Structural insights into the EB1-APC interaction.* EMBO J 24: 261–269.

Hsu SC, Hazuka CD, Roth R, Foletti DL, Heuser J, Scheller RH (1998) *Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments.* Neuron 20: 1111–1122.

Hudson PJ (1999) *Recombinant antibody constructs in cancer therapy.* Curr. Opin. Immunol. 11, 548 – 557.

Huffaker T, Hoyt M, Botstein D (1987) *Genetic analysis of the yeast cytoskeleton.* Annu Rev Genet 21:259–284.

J

Jeong KJ, Jang SH, Velmurugan N (2011) *Recombinant antibodies: engineering and production in yeast and bacterial hosts.* Biotechnol J. 6(1):16-27

Joo E, Tsang CW, Trimble WS (2005) *Septins: traffic control at the cytokinesis intersection.* Traffic 6: 626–634.

K

Kaiser PD, Maier J, Traenkler B, Emele F, Rothbauer U (2014) *Recent progress in generating intracellular functional antibody fragments to target and trace cellular components in living cells.* Biochim Biophys Acta 1844(11):1933–42.

- Karpova TS, Reck-Peterson SL, Elkind NB, Mooseker MS, Novick PJ, Cooper JA (2000) *Role of actin and Myo2p in polarized secretion and growth of Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell 11:1727–1737.
- Kim HB, Haarer BK, Pringle JR (1991) *Cellular morphogenesis in the Saccharomyces cerevisiae cell cycle: localization of the CDC3 gene product and the timing of events at the budding site*. J Cell Biol 112:535–544.
- Kinoshita M (2003) *The septins*. Genome Biol 4: 236.
- Kinoshita M, Field CM, Coughlin ML, Straight AF, Mitchison TJ (2002) *Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins*. Dev Cell 3: 791–802.
- Kinoshita M, Kumar S, Mizoguchi A, Ide C, Kinoshita A, Haraguchi T, Hiraoka Y, Noda M (1997) *Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures*. Genes Dev 11:1535–1547.
- Kirkham, P. M., F. Mortari, et al., (1992) *Immunoglobulin VH clan and family identity predicts variable domain structure and may influence antigen binding*. Embo J 11(2): 603-9.
- Klar A. J. S, (2010) *The Yeast Mating-Type Switching Mechanism: A Memoir*. Genetics vol. 186, p. 443–449.
- Kojima K, Sakai I, Hasegawa A, Niiya H, Azuma T, Matsuo Y, Fujii N, Tanimoto M, Fujita S (2004) *FLJ10849, a septin family gene, fuses MLL in a novel leukemia cell line CNLBC1 derived from chronic neutrophilic leukemia in transformation with t(4;11)(q21;q23)*. Leukemia 18, 998–1005.
- Kohler G, Milstein C (1975) *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature 25, 495–497.
- Kozubowski L, Kelley B, Tatchell K (2001) *The use of FRAP to assay the stability of septin-dependent complexes at the bud neck in yeast*. Mol Biol Cell 12 [Suppl 297].
- Kozubowski L, Larson JR, Tatchell K (2005) *Role of the septin ring in the asymmetric localization of proteins at the mother-bud neck in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell 16: 3455–3466.
- Kozubowski L, Panek H, Rosenthal A, Bloecher A, DeMarini DJ, Tatchell K (2003) *A Bni4-Glc7 phosphatase complex that recruits chitin synthase to the site of bud emergence*. Mol Biol Cell 14: 26–39.
- Kuhlenbaumer G, Hannibal MC, Chance PF (2005) *Mutations in SEPT9 cause hereditary neuralgic amyotrophy*. Nature Genetics 37, 1044–1046.
- Kusch J, Meyer A, Snyder MP, Barral Y (2002) *Microtubule capture by the cleavage apparatus is required for proper spindle positioning in yeast*. Genes Dev 16: 1627–1639.

L

- Lang IM, Barbas CF, Schleef RR (1996) *Recombinant rabbit Fab with binding activity to type-1 plasminogen activator inhibitor derived from a phage-display library against human alpha-granules*. Gene 172(2):295-8.
- Larisch S, Yi Y, Lotan R, Kerner H, Eimerl S, Tony Parks W, Gottfried Y, Birkey Reffey S, de Caestecker MP, Danielpour D, Book-Melamed N, Timberg R, Duckett CS, Lechleider RJ,

- Steller H, Orly J, Kim SJ, Roberts AB (2000) *A novel mitochondrial septinlike protein, ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif*. *Nat Cell Biol* 2: 915–921.
- Lavoie E (Mémoire M.Sc. 2006) *Etude de la fonction cellulaire de SYP1 chez Saccharomyces cerevisiae*. Laval, Quebec
- Lavoie, T. B., W. N. Drohan, *et al.*, (1992) *Experimental analysis by site-directed mutagenesis of somatic mutation effects on affinity and fine specificity in antibodies specific for lysozyme*. *J Immunol* 148(2): 503-13.
- LEFEBVRE F (Thèse 2009) *La polarité cellulaire chez la levure Saccharomyces cerevisiae : Etude de la régulation de la protéine RhoGAP Rgd1 à domaine F-BAR*. Bordeaux 2, France
- Lefief-Delcourt A. (2016) *La levure de bière*. Leducs Editions, p. 22.
- Lefranc M.P., Giudicelli V., Ginestoux C., Bodmer J., Müller W., Bontrop R., Lemaitre M., Malik A., Barbié V., Chaume D., (1999) *IMGT (the international ImmunoGeneTics database)*. *Nucleic Acids Research*, Vol. 27 : 209–212.
- Lei SP, Lin HC, Wang SS, Callaway J, Wilcox G (1987) *Characterization of the Erwinia carotovora pelB gene and its product pectate lyase*. *Journal of bacteriology*, 169(9), 4379–83.
- Lerner RA, Kang AS, Bain JD, Burton DR, Barbas CF, 3rd (1992) *Antibodies without immunization*. *Science* 258: 1313–1314.
- Lew DJ, Reed SI (1995) *Cell cycle control of morphogenesis in budding yeast*. *Curr Opin Genet Dev* 5:17–23.
- Lindsey R, Momany M (2006) *Septin localization across kingdoms: three themes with variations*. *Current Opinion in Microbiology* 9:559–565.
- Lippincott J, Li R (1998a) *Dual function of Cyk2, a cdc15/PSTPIP family protein, in regulating actomyosin ring dynamics and septin distribution*. *J Cell Biol* 143:1947–1960.
- Lippincott J, Li R (1998b) *Sequential assembly of myosin II, an IQGAP-like protein, and filamentous actin to a ring structure involved in budding yeast cytokinesis*. *J Cell Biol* 140:355–366.
- Liu Q, Li MZ, Liu D, Elledge SJ (2000) *Rapid construction of recombinant DNA by the univector plasmid-fusion system*. *Methods Enzymol* 328: 530–549.
- Lofton-Day C, Model F, DeVos T, Tetzner R, Distler J, Schuster M, Song X, Lesche R, Liebenberg V, Ebert M, Molnar B, Grutzmann R, Pilarsky C, Sledziewski A (2008) *DNA Methylation Biomarkers for Blood-Based Colorectal Cancer Screening*. *Clinical Chemistry* 54:2 414–423.
- Longtine MS, Bi E (2003) *Regulation of septin organization and function in yeast*. *Trends Cell Biol* 13: 403–409.
- Longtine MS, DeMarini DJ, Valencik ML, Al-Awar OS, Fares H, De Virgilio C, Pringle JR (1996) *The septins: roles in cytokinesis and other processes*. *Curr Opin Cell Biol* 8:106–119.
- Longtine MS, Fares H, Pringle, JR (1998) *Role of the yeast Gin4p protein kinase in septin assembly and the relationship between septin assembly and septin function*. *J Cell Biol* 143:719–736.
- Longtine MS, Theesfeld CL, McMillan JN, Weaver E, Pringle JR, Lew DJ (2000) *Septin-dependent assembly of a cell cycleregulatory module in Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 20:4049–4061.
- Lovato V (2009) *Antibody phage technology: library construction and applications*. ETH Zurich

Low C, Macara IG (2006) *Structural analysis of septin 2, 6, and 7 complexes*. J Biol Chem 281: 30697–30706.

M

Madden K, Snyder M (1998) *Cell polarity and morphogenesis in budding yeast*. Annu Rev Microbiol 52:687–744.

Magniez F (2008) Les anticorps monoclonaux. Biotechnologies.

Malone J, Sullivan MA (1996) *Analysis of antibody selection by phage display utilizing anti-phenobarbital antibodies*. J Mol Recognit 9 : 738-45.

Marks JD, Griffiths AD, Malmqvist M, Clackson TP, Bye JM, *et al.*, (1992) *Bypassing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling*. Biotechnology (N Y) 10: 779–783.

Marks JD, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G (1992) *Molecular evolution of proteins on filamentous phage. Mimicking the strategy of the immune system*. The Journal of biological chemistry, 267(23), 16007–10.

Marschall A, Dübel S, Böldicke T (2016) *Recent advances with ER targeted intrabodies. Protein targeting compounds. Prediction, selection and activity of specific inhibitors*. Springer p. 77–93.

Marschall AL, Dübel S, Böldicke T (2015) *Specific in vivo knockdown of protein function by intrabodies*. MAbs 7(6):1010-35.

Marschall AL, Zhang C, Frenzel A, Schirrmann T, Hust M, Perez F (2014) *Delivery of antibodies to the cytosol: Debunking the myths*. MAbs 6(4):943–56.

Mendoza M, Hyman AA, Glotzer M (2002) *GTP binding induces filament assembly of a recombinant septin*. Curr Biol 12: 1858–1863.

Mathieu MG, Miles AK, Li G, McArdle SE, Rees RC (2009) *Cancer/testis antigens for therapeutic use*. J. BUON , 14 (Suppl. 1), S97-S102.

Merz DC, Dunn RJ, Drapeau P (1995) *Generating a phage display antibody library against an identified neuron*. J Neurosci Methods 62: 213–219.

Miethe S, Meyer T, Wöhl-Bruhn S, Frenzel A, Schirrmann T, Dübel S, Hust M. (2013) *Production of single chain fragment variable (scFv) antibodies in Escherichia coli using the LEX™ bioreactor*. J Biotechnol. 163(2):105-11.

Mostowy S, Cossart P (2012) *Septins: the fourth component of the cytoskeleton*. Nature Reviews Molecular Cell Biology 13, pages 183–194.

N

Nakagawa T, Cheng Y, Ramm E, Sheng M, Walz T (2005) *Structure and different conformational states of native AMPA receptor complexes*. Nature 433: 545–549.

Neufeld TP, Rubin GM (1994) *The Drosophila peanut gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins*. Cell 77:371–379.

Nguyen TQ, Sawa H, Okano H, White JG (2000) *The C. elegans septin genes, unc-59 and unc-61, are*

required for normal postembryonic cytokineses and morphogenesis but have no essential function in embryogenesis. J Cell Sci 113 (Part 21): 3825–3837.

Nigon V (1949) *Les modalités de la reproduction et le déterminisme du sexe chez quelques nematodes libres.* Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Anim. 11:1–132.

O

O'Connell D, Becerril B, Roy-Burman A, Daws M, Marks JD. (2002) Phage versus phagemid libraries for generation of human monoclonal antibodies. Journal of molecular biology 321(1), 49–56.

Oegema K, Desai A, Wong ML, Mitchison TJ, Field CM (1998) *Purification and assay of a septin complex from Drosophila embryos.* Methods Enzymol 298:279–295.

Ohi M, Li Y, Cheng Y, Walz T (2004) *Negative staining and image classification—powerful tools in modern electron microscopy.* Biol Proced Online 6: 23–34.

Osaka M, Rowley JD, Zeleznik NJ (1999) *MSF (MLL septin-like fusion), a fusion partner gene of MLL, in a therapy-related acute myeloid leukemia with a t(11;17)(q23;q25).* PNAS 96 (11) 6428-6433.

P

Padlan, E. A. (1994) *Anatomy of the antibody molecule.* Mol Immunol 31(3):169-217.

Paschke, M. (2006) *Phage display systems and their applications.* Appl Microbiol Biotechnol. 70(1):2-11.

Peterson, Petty (2010) *Conquering the complex world of human septins: Implications for health and disease.* Clin Genet. 77(6): 511–524.

Philibert P, Stoessel A, Wang W (2007) *A focused antibody library for selecting scFvs expressed at high levels in the cytoplasm.* BMC Biotechnol 7 : 81.

Philipps B, Hennecke J, Glockshuber R (2003) *FRET-based in vivo screening for protein folding and increased protein stability.* J Mol Biol 327: 239–249.

Poul MA, Becerril, B., Nielsen, U. B., Morisson, P., & Marks, J. D. (2000) *Selection of tumor-specific internalizing human antibodies from phage libraries.* Journal of molecular biology, 301(5), 1149–61.

Poul, M.-A. (2009) *Selection of antibodies able to rapidly enter mammalian cells.* Methods in molecular biology (Clifton, ,J.), 562, 155–63

Pruyne D, Bretscher A (2000a) *Polarization of cell growth in yeast.* J Cell Sci 113:571–585.

Pruyne D, Bretscher A (2000b) *Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states.* J Cell Sci 113:365–375.

Pruyne DW, Schott DH, Bretscher A (1998) *Tropomyosincontaining actin cables direct the Myo2p-dependent polarized delivery of secretory vesicles in budding yeast.* J Cell Biol 143:1931–1945.

Q

Qi H, Lu H, Qiu HJ, Petrenko V, Liu A (2012) Phagemid vectors for phage display: properties, characteristics and construction. *Journal of molecular biology*, 417(3), 129–43.

R

- Reinsch S, Karsenti E (1994) *Orientation of spindle axis and distribution of plasma membrane proteins during cell division in polarized MDCKII cells.* J Cell Biol 126: 1509–1526.
- Richardson JH, Marasco WA (1995) *Intracellular antibodies: development and therapeutic potential.* Trends Biotechnol. 13, 306–310.
- Rodi DJ, Soares AS, Makowski L (2002) *Quantitative assessment of peptide sequence diversity in m13 combinatorial peptide phage display libraries.* J Mol Biol 322 : 1039-52.
- Rondon IJ, Marasco WA (1997) *Intracellular antibodies (intrabodies) for gene therapy of infectious diseases.* Annu. Rev. Microbiol. 51, 257 – 283.
- Russell SE, Hall PA (2005) *Do septins have a role in cancer?* Br J Cancer 93: 499–503.

S

- Saerens D, Pellis M, Loris R (2005) *Identification of a universal VHH framework to graft non-canonical antigen-binding loops of camel single-domain antibodies.* J Mol Biol 352 : 597–607.
- Sagot I, Klee SK, Pellman D (2002) *Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables.* Nat Cell Biol 4:42–50.
- Sagona P, Stenmark H (2010) *Cytokinesis and cancer.* FEBS Letters 584, 12, 2652-2661.
- Saraste M, Sibbald PR, Wittinghofer A (1990) *The P-loop – a common motif in ATP- and GTP-binding proteins.* Trends Biochem Sci 15:430–434.
- Schafer WR (2005) *Deciphering the neural and molecular mechanisms of C. elegans behavior.* Current Biology. 15 (17): R723–9.
- Schier R, Marks JD (1996) *Efficient in vitro affinity maturation of phage antibodies using biacore guided selections.* Hum Antibodies Hybridomas 7 : 97-105.
- Schmidt K, Nichols BJ (2004) *A barrier to lateral diffusion in the cleavage furrow of dividing mammalian cells.* Curr Biol 14: 1002–1006.
- Schott D, Ho J, Pruyne D, Bretscher A (1999) *The COOH-terminal domain of Myo2p, a yeast myosin V, has a direct role in secretory vesicle targeting.* J Cell Biol 147:791–808.
- Schott DH, Collins RN, Bretscher A (2002) *Secretory vesicle transport velocity in living cells depends on the myosin-V lever arm length.* J Cell Biol 156:35–40.
- Sergeeva A, Kolonin MG, Mollrem JJ, Pasqualini R, Arap W (2006) *Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents.* Adv Drug Deliv Rev 58 : 1622-54.
- Shaki-Loewenstein S, Zfania R, Hyland S, Wels WS, Benhar I (2005) *A universal strategy for stable intracellular antibodies.* J Immunol Methods 303(1–2):19–39.
- Sheffield PJ, Oliver CJ, Kremer BE, Sheng S, Shao Z, Macara IG (2003) *Borg/septin interactions and the assembly of mammalian septin heterodimers, trimers, and filaments.* J Biol Chem 278: 3483–3488.
- Sheu YJ, Santos B, Fortin N, Costigan C, Snyder M (1998) *Spa2p interacts with cell polarity proteins and signaling components involved in yeast cell morphogenesis.* Mol Cell Biol

18:4053–4069.

Skerra A, Plückthun A (1988) *Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli*. *Science* 240(4855), 1038–41.

Sliwkowski MX, Mellman I (2013) *Antibody therapeutics in cancer*. *Science* 341:1192–1198.

Smith GP (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228: 1315–1317.

Snyder M (1989) *The SPA2 protein of yeast localizes to sites of cell growth*. *J Cell Biol* 108:1419–1429.

Souriau C, Hua T, Lefranc M, Weill M (1998) *Présentation à la surface de phages filamenteux : Les multiples applications du phage display*. *Médecine/sciences ; 14* : 300-9.

Spiliotis ET, Kinoshita M, Nelson WJ (2005) *A mitotic septin scaffold required for Mammalian chromosome congression and segregation*. *Science* 307: 1781–1785.

Stefan D (2007) *Handbook of Therapeutic Antibodies*. p.1228 Wiley-VCH Verlag GmbH.

Steinmetz MO, Stock A, Schulthess T, Landwehr R, Lustig A, Faix J, Gerisch G, Aebi U, Kammerer RA (1998) *A distinct 14 residue site triggers coiled-coil formation in cortexillin I*. *EMBO J* 17: 1883–1891.

Stocks M (2005) *Intrabodies as drug discovery tools and therapeutics*. *Curr Opin Chem Biol* 9(4):359–65.

Stoessel A (Thèse 2012) *Sélection et ingénierie de fragments d'anticorps pour des applications de thérapie du cancer et de diagnostic*. Strasbourg, France

Suter M, Riek U, Tuerk R, Schlattner U, Wallimann T, Neumann D (2006) *Dissecting the role of 50-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase*. *J Biol Chem* 281: 32207–32216.

T

Takizawa PA, DeRisi JL, Wilhelm JE, Vale RD (2000) *Plasma membrane compartmentalization in yeast by messenger RNA transport and a septin diffusion barrier*. *Science* 29:341–344.

Tanaka T, Rabbitts TH (2008) *Functional intracellular antibody fragments do not require invariant intra-domain disulfide bonds*. *J Mol Biol* 376 : 749–57.

Tavladoraki P, Benvenuto E, Trinca S, De Martinis D, Cattaneo A, Galeffi P (1993) *Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack*. *Nature* 366 , 469 – 472.

TerBush DR, Maurice T, Roth D, Novick P (1996) *The exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 15:6483–6494.

Tucker J, Sczakiel G, Feuerstein J, John J, Goody RS, Wittinghofer A (1986) *Expression of p21 proteins in Escherichia coli and stereochemistry of the nucleotide-binding site*. *EMBO J* 5: 1351–1358.

Trimble WS (1999) *Septins: a highly conserved family of membrane-associated GTPases with functions in cell division and beyond*. *J Membr Biol* 169:75–81.

V

- Valle G, Jones EA, Colman A (1982) *Anti-ovalbumin monoclonal antibodies interact with their antigen in internal membranes of Xenopus oocytes*. *Nature* 300(5887): 71–4.
- Vallen EA, Caviston J, Bi E (2000) *Roles of Hof1p, Bni1p, Bnr1p, and myo1p in cytokinesis in Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 11:593–611.
- Valtz N, Herskowitz I (1996) *Pea2 protein of yeast is localized to sites of polarized growth and is required for efficient mating and bipolar budding*. *J Cell Biol* 135:725–739.
- Vieillemard A (Thèse 2011) *Implication de la RhoGAP Rgd1p dans la polarité cellulaire chez les levures Candida albicans et Saccharomyces cerevisiae*. Bordeaux 2, France
- Versele M, Gullbrand B, Shulewitz MJ, Cid VJ, Bahmanyar S, Chen RE, Barth P, Alber T, Thorner J (2004) *Protein–protein interactions governing septin heteropentamer assembly and septin filament organization in Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 15: 4568–4583.
- Versele M, Thorner J (2004) *Septin collar formation in budding yeast requires GTP binding and direct phosphorylation by the PAK, Cla4*. *J Cell Biol* 164: 701–715.
- Versele M, Thorner J (2005) *Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual*. *Trends Cell Biol* 15: 414–424.
- Viti F, Nilsson F, Demartis S, Huber A, Neri D (2000) *Design and use of phage display libraries for the selection of antibodies and enzymes*. *Methods Enzymol.* 326:480-505
- Visintin M, Settanni G, Maritan A (2002) *The intracellular antibody capture technology (IACT) : towards a consensus sequence for intracellular antibodies*. *J Mol Biol* ; 317 : 73–83.
- Vrabioiu AM, Gerber SA, Gygi SP, Field CM, Mitchison TJ (2004) *The majority of the Saccharomyces cerevisiae septin complexes do not exchange guanine nucleotides*. *J Biol Chem* 279: 3111–3118.

W

- Weber M (Thèse 2014) *Novel phage display libraries and selection technologies for the isolation of fully human antibodies for pharmaceutical applications*. Zurich, Suisse
- Wingren C, Borrebaeck CA (2008) *Antibody microarray analysis of directly labelled complex proteomes*. *Curr Opin Biotechnol.* 19(1):55-61.
- Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR (1994) *Making antibodies by phage display technology*. *Annu Rev Immunol* 12: 433–455.

Z

- Zhang J, Kong C, Xie H, McPherson PS, Grinstein S, Trimble WS (1999) *Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP*. *Curr Biol* 9:1458–1467.

