



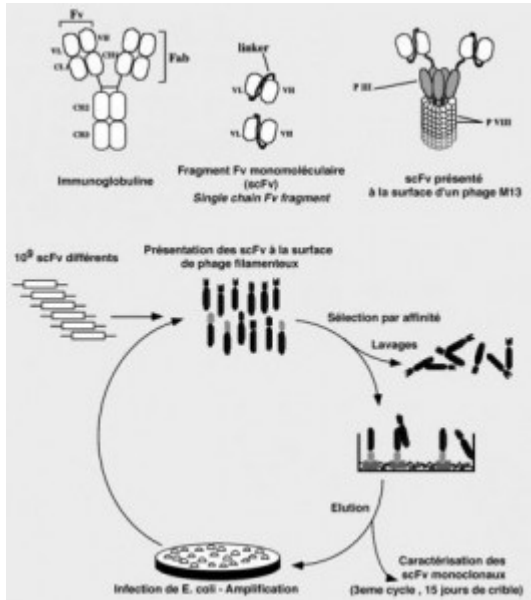
Franck Perez

**Chef d'équipe**

franck.perez@curie.fr

Tél : +33 1 56 24 63 88

**Notre travail s'oriente selon deux grands axes, avec chaque fois un important espace dévolu aux développements technologiques. D'une part, nous nous intéressons à la dynamique de l'appareil de Golgi, plateforme centrale de traitement et de tri des voies de trafic intracellulaire. D'autre part, nous étudions les mécanismes régulant la dynamique des microtubules, et plus particulièrement le rôle joué par des protéines de la famille de CLIP-170 dans ce contrôle.**



*Sélection d'anticorps in vitro par Antibody Phage Display. Des fragments d'anticorps correspondant aux parties variables d'anticorps (VH et VL) sont exprimés en fusion avec la protéine pIII à la surface de phages filamenteux de type M13. Les phages issus d'une banque sont sélectionnés par affinité de liaison à un antigène immobilisé. Les clones sélectionnés sont récupérés dans des bactéries puis utilisés pour un nouveau cycle de sélection. L'ensemble de la sélection dure entre 6 et 15 jours (3 cycles).*

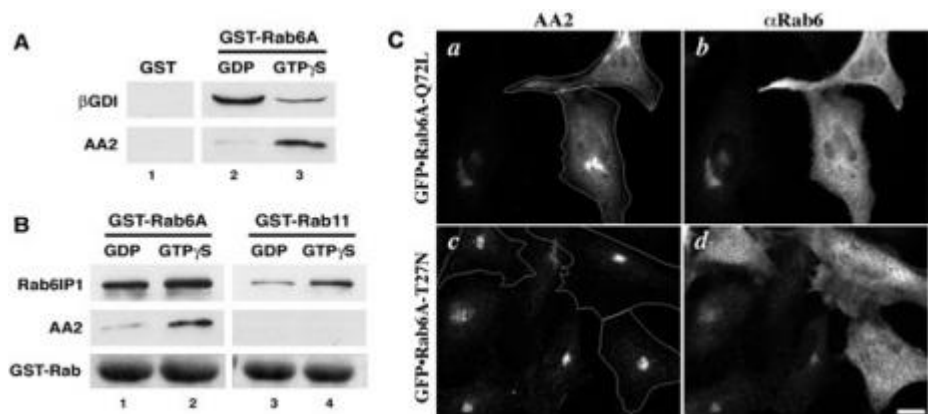
Pour ces études, nous avons développé des méthodes permettant d'obtenir des outils uniques, comme les anticorps recombinants, dont nous étendons maintenant les applications, notamment au domaine thérapeutique.

Nos approches sont fondées sur des méthodes d'imagerie des cellules vivantes, d'analyse quantitative du trafic intracellulaire et de la dynamique des microtubules et sur l'utilisation de perturbateurs de la fonction normale des protéines cellulaires (siRNA, mutants, molécules). Plus récemment, nous avons contribué à la mise en place d'une plateforme de criblage cellulaire à haut débit (*BioPhenics*, Département de Transfert). Un investissement plus particulier a été fait ces dernières années pour adapter les méthodes de sélection d'anticorps recombinants aux questions de la biologie cellulaire (Nizak et al., 2005).

La banque d'anticorps recombinants que nous utilisons est une banque de scFv (single chain Fv fragments: fragments Fv dont les chaînes lourdes et légères sont réunies dans la même molécule), comportant plus de  $10^9$  clones différents, elle a été obtenue auprès du laboratoire de Greg Winter (MRC, Cambridge, GB).

## 1 - Les anticorps recombinants

Notre équipe a développé de nouvelles méthodes de sélection d'anticorps permettant de préparer les antigènes cibles sans passer par l'expression et la purification chez *E. coli*. Nous avons aussi mis au point des



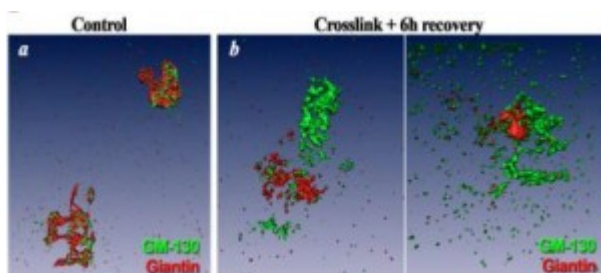
procédés permettant de sélectionner des anticorps dirigés contre certaines conformations des protéines cibles ou contre des modifications post-traductionnelles. Nous avons également simplifié et amélioré la production d'anticorps recombinants.

Ces méthodes mises au point par notre équipe sont utilisées dans des programmes de recherche en biologie cellulaire et pour des projets appliqués au traitement de certains cancers. En collaboration avec l'équipe "Cellules dendritiques et présentation antigénique" nous tentons notamment d'améliorer l'efficacité d'un anticorps ciblant la surface de nombreuses cellules cancéreuses.

*A,B:AA2 interagit directement avec GST-Rab6A fixée à une résine lorsque Rab6A est liée au GTPγS mais pas lorsqu'elle est liée au GDP, et se comporte donc à l'inverse de la protéine GDI utilisée comme témoin (A). AA2 ne se lie cependant pas à Rab11 à la différence de certains effecteurs comme Rab6IP1 qui se lie aux formes actives de Rab6A et Rab11 (B). C: AA2 détecte efficacement les protéines Rab6 mutantes verrouillées sous une forme active (a,b) exprimée par les cellules transfectées (entourées). Les formes de Rab6 verrouillées sous une conformation inactive ne sont pas détectées (c,d). Dans ce cas seule la protéine Rab6 endogène est détectée ce qui permet de suivre l'effet de la surexpression de mutants inactifs sur le comportement de la protéine Rab6 endogène.*

Notre équipe s'intéresse également aux anticorps sensibles aux changements conformationnels ou aux modifications post-traductionnelles. Ces anticorps peuvent être utilisés comme anticorps intra-cellulaires (intrabodies) pour suivre la dynamique des protéines endogènes (Nizak *et al.*, 2003a,b). Nous avons par exemple sélectionné un anticorps sensible aux changements conformationnels de la tubuline (voir plus loin) et des anticorps spécifiquement dirigés contre les formes liées au GTP de la petite GTPase Rab6 (Figure 2, Nizak *et al.*, 2003).

## 2 - Structure, dynamique et fonction de l'appareil de Golgi



*GM130 et Giantine partitionnent de façon différentielle après inactivation de l'appareil de Golgi.*

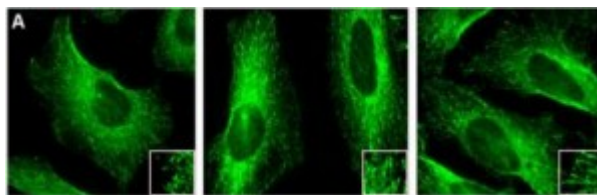
*Les protéines de la matrice GM130 (verte) et Giantine (rouge) sont fortement juxtaposées dans des cellules témoins (a). Après inactivation, GM130 marque les appareils de Golgi néo-formés et immatures alors que la Giantine reste co-localisée avec les appareils de Golgi inactivés. (image obtenues par immuno-fluorescence suivie d'une déconvolution) (Jollivet et al., 2007)*

Notre équipe étudie le rôle de l'appareil de Golgi dans l'organisation cellulaire (Chabin-Brion *et al.*, 2001) et les fonctions de certaines protéines localisées en périphérie. Ces protéines font partie de la matrice golgienne et sont organisées autour du complexe formé par les protéines Giantine/GM130/p115. Nous avons étudié la Giantine (Nizak *et al.*, 2003b), et les protéines Rab1 et Rab6. (Del Nery, 2006 ; Sannerud, 2006 ; Miserey-Lenkei, 2006). Plus récemment, en collaboration avec Y. Wang (University of Michigan, USA), nous avons entrepris l'étude de GRASP-65, une autre protéine de la matrice golgienne, plus particulièrement mise en jeu dans la structuration de l'appareil de Golgi et dans sa dynamique mitotique. Pour étudier la maintenance de l'appareil de Golgi, nous avons étudié son mode d'héritage pendant la division cellulaire (Nizak *et al.*, 2004). Par ailleurs, nous avons développé une méthode permettant d'inactiver l'appareil de Golgi dans des cellules vivantes. Cela nous a permis de proposer que l'appareil de Golgi se forme à partir d'éléments appartenant au réticulum endoplasmique mais que sa maturation finale, fonctionnelle et structurale, nécessite des composants transportés de façon rétrograde depuis les membranes golgiennes déjà formées (Jollivet *et al.*, 2007). Nous avons maintenant entrepris de mettre en place un système générique permettant d'étudier finement l'activité de l'appareil de Golgi.

## 3 - CLIP170, CLIPR et Dynamique des microtubules

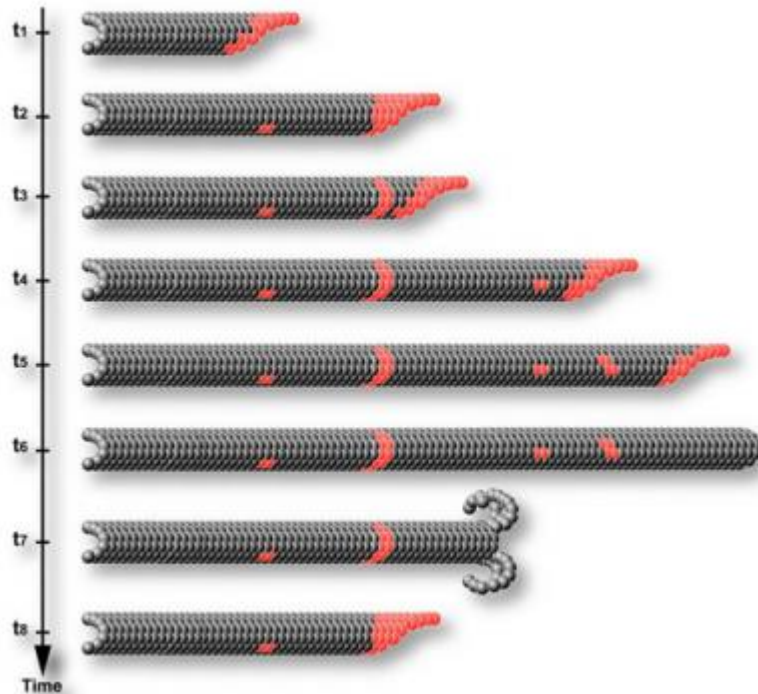
Les microtubules sont des éléments polarisés et dynamiques du cytosquelette dont l'extrémité *moins*, à polymérisation lente, est en général orientée vers le centre de la cellule, et dont l'extrémité *plus* est dirigée vers la périphérie de la cellule. Les microtubules sont dynamiquement instables, alternant de façon apparemment stochastique entre des phases de polymérisation et de dépolymérisation séparées par des événements de catastrophe et de sauvetage.

Nous étudions la régulation de la dynamique des microtubules (Marceiller *et al.*, 2005, coll. Équipe de Christian Poüs, Chatenay-Malabry) et certaines protéines de type CLIP (*cytoplasmic linker proteins*) mises en jeu dans la régulation de l'instabilité dynamique. Nous avons montré il y a quelques années (Perez *et al.*, 1999, Diamantopoulos, 1999) que la protéine CLIP-170 se localise à l'extrémité *plus* de microtubules en phase de croissance (Figure 4), fondant ainsi la classe de protéines nommées +TIPs (+ end tracking proteins). Nous travaillons également à l'analyse fonctionnelle de CLIPR-59, une protéine apparentée à CLIP-170 et qui régule de façon négative la dynamique des microtubules (Perez *et al.*, 2002, Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2004).



*Localisation intracellulaire de CLIP-170. Des cellules HeLa ont été fixées et marquées en immunofluorescence par un anticorps dirigé contre CLIP-170. Le marquage en forme de comète de CLIP-170 correspond à des microtubules en phase de croissance.*

**A**



(P)

(P)

(P)

(P)

(P)

(C)

(D)

(R)

Plus récemment, nous avons sélectionné un anticorps sensible aux changements de conformation de la tubuline et nous avons ainsi pu vérifier la présence d'une coiffe de GTP à l'extrémité des microtubules en phase de polymérisation ainsi que la présence inattendue d'îlots de GTP dans le polymère. Ceci nous a conduit à proposer un nouveau modèle d'instabilité dynamique des microtubules.

*Un nouveau modèle pour la dynamique des microtubules. Les microtubules en phase de croissance polymérisent (P) en incorporant de la tubuline liée au GTP à l'extrémité plus (tubuline-GTP en rouge) qui est hydrolysée peu après l'assemblage (tubuline GDP en noir), créant ainsi une coiffe GTP. Des défauts d'hydrolyse peuvent survenir emprisonnant des îlots de tubuline-GTP dans le polymère (voir t3). Lorsque la coiffe GTP est perdue, le microtubule est déstabilisé, subit une catastrophe (C) et dépolymérise (D). Lorsqu'un îlot de GTP se retrouve à l'extrémité du microtubule en dépolymérisation, il peut jouer le rôle d'une coiffe GTP et un sauvetage (rescue, R) peut survenir, permettant au microtubule de reprendre sa polymérisation (Dimitrov et al., 2008)*

## Publications clés

Année de publication : 2019

Lou Fourriere, Amal Kasri, Nelly Gareil,



## Dynamique de l'organisation intra-cellulaire UMR144 - Biologie Cellulaire et Cancer

Sabine Bardin, Hugo  
Bousquet, David  
Pereira, Franck  
Perez, Bruno Goud,  
Gaelle Boncompain,  
Stéphanie Miserey-  
Lenkei (2019 May  
31)

**RAB6 and  
microtubules  
restrict protein  
secretion to  
focal adhesions.**

*The Journal of cell  
biology* : DOI :

[10.1083/jcb.201805  
002](https://doi.org/10.1083/jcb.201805002)

**Année de  
publication : 2014**

---

Ana Joaquina  
Jimenez, Paolo  
Maiuri, Julie  
Lafaurie-Janvore,  
Séverine Divoux,  
Matthieu Piel,  
Franck Perez (2014  
Jan 30)

**ESCRT  
machinery is  
required for  
plasma  
membrane  
repair.**

*Science (New York,  
N.Y.)* : 1247136 :

DOI :  
[10.1126/science.124  
7136](https://doi.org/10.1126/science.1247136)



## Dynamique de l'organisation intra-cellulaire UMR144 - Biologie Cellulaire et Cancer

**Année de  
publication : 2013**

---

Sardar Faisal  
Mahmood, Nadège  
Gruel, Elodie  
Chapeaublanc,  
Aurianne Lescure,  
Thouis Jones, Fabien  
Reyal, Anne Vincent-  
Salomon, Virginie  
Raynal, Gaëlle  
Pierron, Franck  
Perez, Jacques  
Camonis, Elaine Del  
Nery, Olivier  
Delattre, François  
Radvanyi, Isabelle  
Bernard-Pierrot  
(2013 Oct 22)

**A siRNA screen  
identifies RAD21,  
EIF3H, CHRAC1  
and TANC2 as  
driver genes  
within the 8q23,  
8q24.3 and  
17q23 amplicons  
in breast cancer  
with effects on  
cell growth,  
survival and  
transformation.**

*Carcinogenesis* :  
670-82 : [DOI:  
10.1093/carcin/bgt3  
51](https://doi.org/10.1093/carcin/bgt351)

**Année de  
publication : 2011**

---

Gaëlle Boncompain,





## Dynamique de l'organisation intra-cellulaire UMR144 - Biologie Cellulaire et Cancer

Severine Divoux,  
Nelly Gareil, Helene  
de Forges, Aurianne  
Lescure, Lynda  
Latreche, Valentina  
Mercanti, Florence  
Jollivet, Graça  
Raposo, Franck  
Perez (2011 Aug 2)

### **Synchronization of secretory protein traffic in populations of cells.**

*Nature methods* :

493-8 : [DOI :](#)

[10.1038/nmeth.1928](https://doi.org/10.1038/nmeth.1928)

**Année de  
publication : 2008**

---

Ariane Dimitrov,  
Mélanie Quesnoit,  
Sandrine Moutel,  
Isabelle Cantaloube,  
Christian Poüs,  
Franck Perez (2008  
Oct 16)

### **Detection of GTP-tubulin conformation in vivo reveals a role for GTP remnants in microtubule rescues.**

*Science (New York,*

*N.Y.)* : 1353-6 : [DOI :](#)

[10.1126/science.1165401](https://doi.org/10.1126/science.1165401)



## Dynamique de l'organisation intra-cellulaire UMR144 - Biologie Cellulaire et Cancer

**Année de  
publication : 2007**

---

Florence Jollivet,  
Graça Raposo,  
Ariane Dimitrov,  
Rachid Sougrat,  
Bruno Goud, Franck  
Perez (2007 Sep 12)

**Analysis of de  
novo Golgi  
complex  
formation after  
enzyme-based  
inactivation.**

*Molecular biology of  
the cell* : 4637-47