

Un premier modèle avait été proposé vers 1960, à partir d'études de Toku Kanaseki et de Ken Kadota, de l'Université d'Osaka. En 1969, T. Kanaseki et K. Kadota purifièrent des vésicules enveloppées et découvrirent que la structure de ces enveloppes avait une régularité étonnante. L'explication de cette régularité apparut six ans plus tard, lorsque Barbara Pearse, à Cambridge, découvrit que cette enveloppe était principalement composée de plusieurs exemplaires d'une protéine qu'elle nomma clathrine. T. Kanaseki et K. Kadota comprirent ensuite que le bourgeonnement provenait de cette protéine : l'élaboration de la « cage » de clathrine, probablement à partir d'éléments membranaires, déformerait la membrane sous-jacente (qui est une structure très malléable) pour constituer, une fois détachée de la membrane d'origine, la fameuse vésicule enveloppée.

Vers 1984, ce modèle simple avait montré ses limites. Lorsque J. Rothman obtint un bourgeonnement dans ses tests *in vitro*, il observa que ce processus ne pouvait pas se produire à partir des membranes isolées seules : le cytosol était nécessaire, ainsi qu'une source d'énergie, ce qui indiquait que l'enveloppe provenait de substances

contenues dans le cytosol. Toutefois le modèle originel de T. Kanaseki et K. Kadota était attrayant et méritait d'être testé.

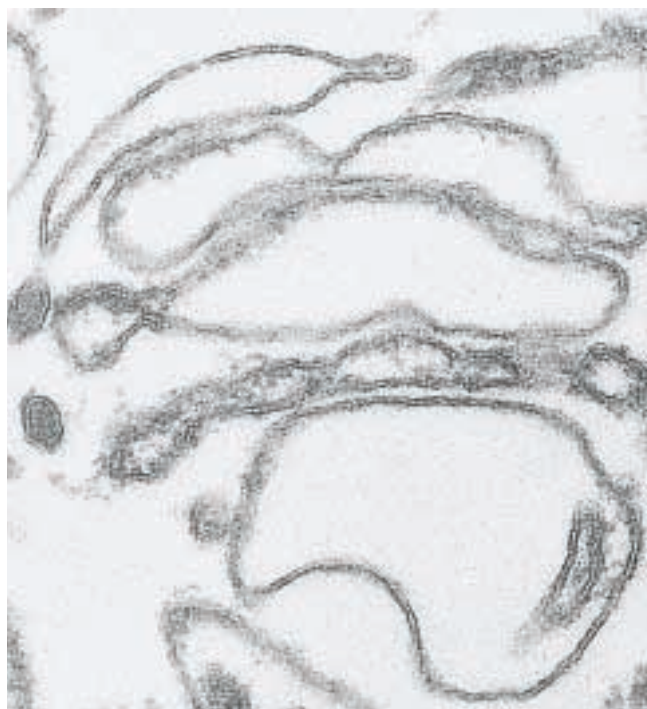
Peu après le retour de J. Rothman à Stanford, l'un de ses étudiants commença à donner suite au projet : Benjamin Glick forma, *in vitro*, des vésicules de transport en incubant l'appareil de Golgi en présence de cytosol et d'une source d'énergie. Il envoya alors à Genève les échantillons qu'il avait prélevés pour une analyse au microscope. En quelques jours, l'équipe genevoise détermina que les vésicules issues de l'appareil de Golgi étaient effectivement recouvertes d'une enveloppe, mais d'un type complètement différent des enveloppes de clathrine : les anticorps spécifiques contre la clathrine ne la

reconnaissaient d'ailleurs pas. Ainsi les cellules utilisaient au moins deux classes de vésicules de transport. On sait aujourd'hui qu'il y a encore d'autres sortes de vésicules de transport et qu'à chacune correspond une enveloppe distincte.

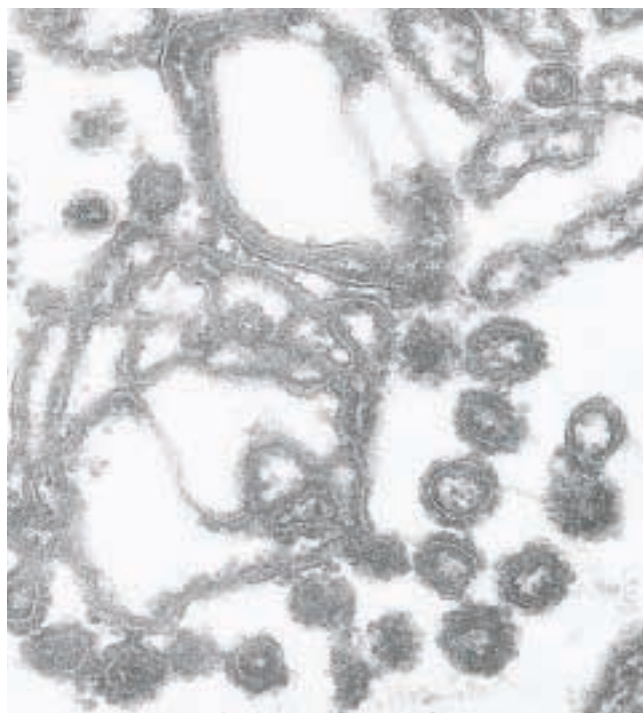
Cette première observation montre l'intérêt des erreurs : notre hypothèse erronée – la présence d'enveloppe de clathrine autour des vésicules de l'appareil de Golgi – nous a amenés à faire une expérience qui nous a détournés des vésicules recouvertes de clathrine et nous a conduits vers une nouvelle voie de recherche qui a permis d'élucider la formation des vésicules de transport en général. Entre-temps, la compréhension des mécanismes de formation des vésicules recouvertes de clathrine a pro-



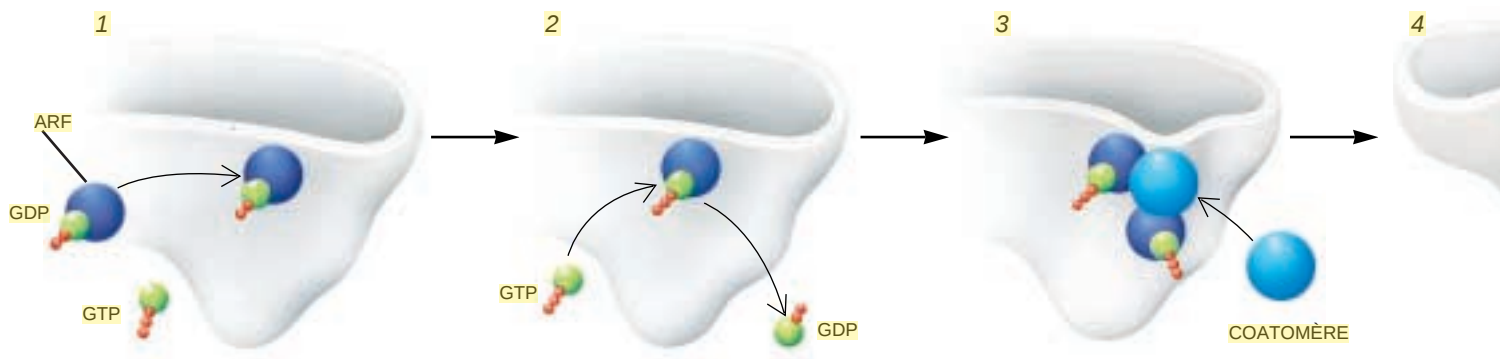
3. Deux vésicules COP en cours de bourgeonnement, à partir d'une membrane de l'appareil de Golgi.



4. LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE a révélé que le bourgeonnement des vésicules COP est commandé par les coatomères (voir la figure 5). Lorsque seule la protéine ARF est fixée aux membranes de l'appareil de Golgi, aucun bourgeonnement ne se produit ; les membranes



restent planes (micrographie de gauche). En revanche, la liaison de coatomères à ces membranes, déjà pourvues de molécules d'ARF, déclenche le bourgeonnement de vésicules enveloppées (micrographie de droite).



5. LA FORMATION D'UNE VÉSICULE COP sur une membrane de l'appareil de Golgi est bientôt suivie de l'élimination de l'enveloppe. La vésicule commence à se développer (1) quand une protéine, l'ARF, liée à une très petite molécule nommée GDP, adhère à la membrane. Bientôt (2) une enzyme remplace la GDP par la GTP, modification qui permet à l'ARF de recruter un complexe de protéines : le coatomère

(3). La liaison de l'ARF et de coatomères provoque la formation d'un bourgeon (4), puis son détachement (5) de la membrane. La vésicule ne fusionne ensuite avec son organite cible qu'après l'élimination de son enveloppe, ce qui se produit lorsque la conversion de la GTP en GDP, par libération d'un groupe phosphate (partie droite de 5), provoque le détachement des molécules d'ARF et des coatomères (6 et 7).

gressé plus lentement ; il y a peu de temps que l'on a obtenu un système acellulaire pour les étudier.

Pour comprendre comment se forment les vésicules issues de l'appareil de Golgi, nous devons d'abord connaître la composition de leur enveloppe. Cette recherche dura plusieurs années. Avant tout, il nous fallait isoler un échantillon pur de ces sphères minuscules, ce qui était alors une tâche redoutable. Après bien des déboires, en 1989, Vivek Malhotra et Tito Serafini en isolèrent une quantité infime, mais suffisante pour des analyses qui démontrèrent que l'enveloppe était composée de huit types de protéines que nous avons nommées protéines COP (de l'anglais *COat Protein*, c'est-à-dire «protéine d'enveloppe»).

Un nouveau type d'enveloppe

Pour clarifier le mécanisme du bourgeonnement, nous avons alors étudié les protéines COP et leurs interactions. En 1990, nous avons d'abord découvert que sept des huit types de protéines COP forment un gros complexe avant de se fixer en bloc à la membrane de Golgi. Nous avons nommé coatomères ces complexes ; les protéines de la huitième sorte se fixaient indépendamment. Cette découverte simplifiait les choses : nous pouvions dès lors analyser les étapes principales du bourgeonnement sans devoir étudier séparément chaque protéine de l'enveloppe.

Puis la chance intervint, et nos esprits, préparés à la recevoir, en tirèrent parti. Un soir de 1990, dans le labo-

ratoire de J. Rothman, Gerard Waters était en train d'examiner ses résultats après avoir essayé de purifier une substance qui est nécessaire pour que les vésicules de transport fusionnent avec les membranes des organites cibles. Par pure coïncidence, T. Serafini passait par là et, en regardant par-dessus l'épaule de G. Waters, il fut stupéfait de ce qu'il aperçut.

Expliquons brièvement pourquoi. Pour purifier une protéine, on sépare les composants d'un extrait cellulaire en différents groupes, ou fractions, selon leurs propriétés physiques et chimiques, puis on teste chaque fraction à la recherche de l'activité attendue (on examine, dans notre cas, si la fraction provoque la fusion d'une vésicule et d'une membrane). Puis on subdivise les fractions actives et l'on teste à nouveau les fractions de fractions. Généralement on élimine les fractions inactives. On obtient finalement un échantillon ne contenant que la protéine douée de l'activité biologique considérée : une protéine purifiée.

Par acquit de conscience, G. Waters venait d'analyser encore une fois le contenu protéique d'une fraction qui n'était pas active et que, depuis des mois, il éliminait parce qu'elle semblait inutile. C'est précisément ce contenu protéique qui avait frappé T. Serafini, tant il ressemblait à ce que lui-même et V. Malhotra avaient précédemment identifié comme les protéines COP.

Rapidement l'analyse montra que la fraction inactive était, en effet, presque essentiellement constituée de sept protéines COP, étroite-

ment associées. Nous savions qu'elles étaient associées, car cette fraction résistait obstinément à toute tentative de fractionnement supplémentaire. C'était un comble ! Tandis qu'une partie du laboratoire de J. Rothman s'évertuait à isoler des vésicules enveloppées (afin d'obtenir des quantités infimes des protéines de l'enveloppe), l'autre possédait ces mêmes protéines à foison, et les jetait ! Grâce à la vigilance de T. Serafini et de G. Waters, ce gaspillage prit fin, on admit l'existence du coatomère et des années d'efforts furent épargnées. Nous avons maintenant à notre disposition une source intarissable des protéines du coatomère.

Nous nous sommes alors intéressés à la huitième protéine. Pour diverses raisons, nous soupçonnions qu'elle correspondait à une molécule dénommée ARF (pour *Adenosine-diphosphate Ribosylation Factor*, ou «facteur de ribosylation de l'adénosine diphosphate»). Cette molécule fut décrite pour la première fois par Richard Kahn et Alfred Gilman, de l'Université du Texas, et l'on savait qu'elle permettait à la toxine du choléra de provoquer la maladie. Toutefois son rôle «normal» chez l'individu demeurait un mystère. Grâce à R. Kahn, qui nous donna des anticorps spécifiques contre cette molécule, nous avons établi que la huitième protéine COP était bien l'ARF.

Après six années de travail acharné, nous avions ainsi toutes les protéines de l'enveloppe à l'état pur et nous étions enfin prêts à décrypter le mécanisme du bourgeonnement. Nous avons commencé ce projet en 1991,