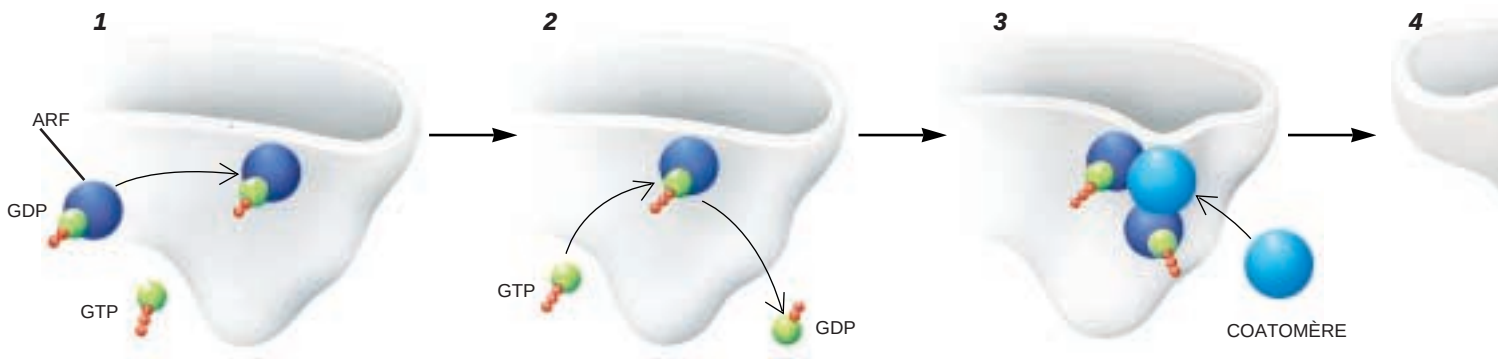




**5. LA FORMATION D'UNE VÉSICULE COP** sur une membrane de l'appareil de Golgi est bientôt suivie de l'élimination de l'enveloppe. La vésicule commence à se développer (1) quand une protéine, l'ARF, liée à une très petite molécule nommée GDP, adhère à la membrane. Bientôt (2) une enzyme remplace la GDP 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.

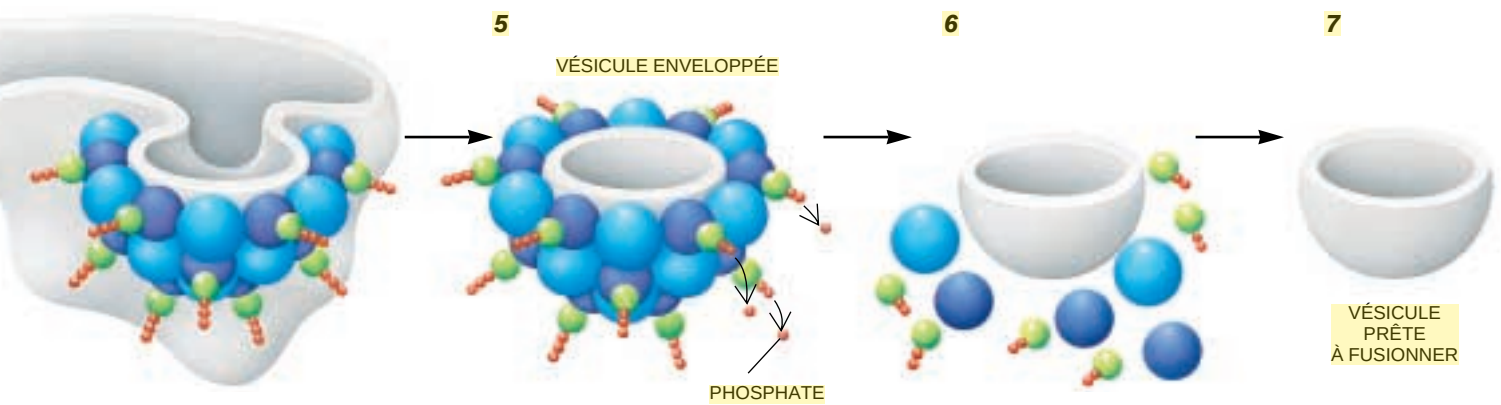
Par acquit de conscience, G. Waters venait d'analyser encore une fois le contenu protéique d'une fraction qui n'était pas active et que, depuis des mois, il éliminait parce qu'elle semblait inutile. C'est précisément ce contenu protéique qui avait frappé T. Serafini, tant il ressemblait à ce que lui-même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



après le déménagement du laboratoire de J. Rothman au Centre de recherche sur le cancer Memorial Sloan-Kettering, à New York, et nous avons énormément progressé en deux années seulement.

## Le bourgeonnement est dévoilé

Nous nous sommes d'abord demandés si le coatomère et l'ARF étaient les seules protéines nécessaires au bourgeonnement des vésicules COP issues de l'appareil de Golgi : d'autres protéines intervenaient-elles au moment du bourgeonnement ? Un premier travail a montré que non. Bien que nous ayons initialement utilisé des extraits de cytosol brut, contenant plusieurs milliers de protéines différentes, les méthodes de la biochimie ont indiqué que le coatomère et l'ARF faisaient le travail toutes seules.

Puis nous avons voulu ajouter les protéines une par une, et non toutes ensemble, afin de déterminer les rôles respectifs de chacune. Nous avons observé que l'ARF se fixait à la membrane de l'appareil de Golgi en l'absence du coatomère, puis attachait ce dernier à la membrane. Ainsi le coatomère ne s'associe pas directement à l'appareil de Golgi. La microscopie électronique révéla que, lorsque l'ARF est fixé seul à la membrane de l'appareil de Golgi, celle-ci demeure plane, alors que l'ajout de coatomère et d'ARF provoque le bourgeonnement d'une vésicule. Ainsi l'ARF et le coatomère ont des rôles distincts dans la formation des vésicules de transport : le coatomère commande la déformation de la membrane et le bourgeonnement, tandis que l'ARF déclenche ces événements, en signifiant au coatomère où et quand faire son travail.

Nous avons ensuite progressivement élucidé des étapes intermédiaires du bourgeonnement. L'ARF, qui flotte dans le cytosol, est normalement reliée à une molécule de guanosine diphosphate (GDP) : une molécule composée d'une base azotée, d'un sucre et de deux groupes phosphate. Lorsque le complexe du GDP relié à l'ARF rencontre l'appareil de Golgi, une enzyme membranaire remplace le GDP par une molécule apparentée provenant du cytosol, la guanosine triphosphate (GTP), qui porte trois groupes phosphate. Cette modification est doublement importante : d'une part, seule l'ARF associée à la GTP peut s'arrimer solidement à la membrane, ce qui permet ensuite au coatomère de se lier ; d'autre part, la fixation de la GTP sur l'ARF apporte une énergie qui est importante pour la formation de la vésicule.

Comment s'effectue alors le bourgeonnement ? Chaque coatomère s'accroche à la membrane par une ou plusieurs molécules d'ARF ; leur nombre exact n'est vraisemblablement ni constant ni important. Nous pensons (mais nous n'en avons pas encore la preuve) que ces complexes s'enchaînent alors régulièrement, les uns à côté des autres, jusqu'à former une cage analogue à celles de clathrine sur la membrane. Progressivement ce réseau s'accroît et s'incurve, transformant en vésicule la partie de membrane qui est emprisonnée dans l'enveloppe. L'émergence des vésicules COP résulte ainsi du même mécanisme que celui qui engendre les vésicules recouvertes de clathrine. Pour qu'une vésicule bourgeonne, une nouvelle enveloppe doit s'élaborer, pièce par pièce, à partir de constituants du cytosol ; en outre, l'assemblage est commandé par l'ARF et nécessite de l'énergie apportée par la GTP.

Bien que l'enveloppe soit primordiale pour le bourgeonnement des vési-

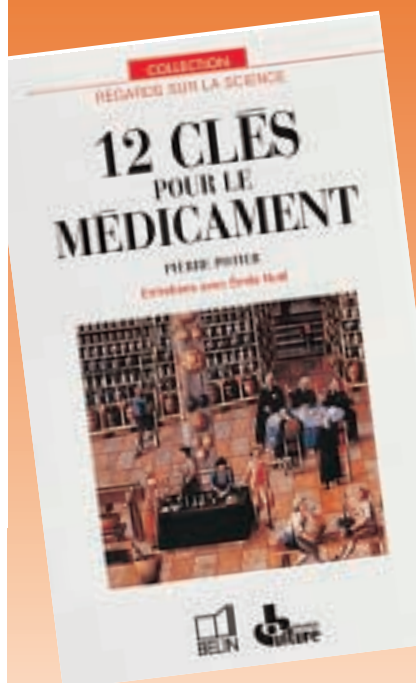
cules COP, elle empêche ultérieurement la fusion de la membrane de la vésicule avec celle de l'organite cible ; la vésicule doit donc perdre son enveloppe pour fusionner avec sa cible et y déverser son contenu. Ce « déshabillage » se fait par le mécanisme inverse de celui qui élabore l'enveloppe : dans une vésicule portant encore son enveloppe, les molécules d'ARF restent associées à la GTP. Bientôt pourtant, un groupe phosphate de la GTP est coupé, formant la GDP et libérant de l'énergie. De ce fait, les molécules ARF perdent leur affinité pour la membrane vésiculaire et s'en détachent. Les coatomères se dissocient également, puisque l'ARF est indispensable à leur liaison ; ils laissent derrière eux une vésicule « dévêtue », libre de fusionner avec un organite cible. Ainsi, au cours du bourgeonnement, la cellule installe quelques « bombes GTP à retardement » dans l'enveloppe, à la suite de quoi les charges éclatent pour éliminer cette enveloppe.

Comme celle-ci se désagrège avant que la vésicule n'atteigne sa destination, elle ne sert manifestement pas à diriger la vésicule vers sa cible. On suppose plutôt que la membrane vésiculaire contient d'autres protéines qui se chargent de cette fonction et qui attirent également des protéines supplémentaires nécessaires à la fusion proprement dite des vésicules avec la membrane de leur cible.

## Un mécanisme commun

Toutes les vésicules de transport se forment-elles comme les vésicules COP ? On l'a pensé quand des collègues de J. Rothman ont découvert que l'élaboration de l'enveloppe de clathrine est également déclenchée par la fixation, sur les membranes, de molécules d'ARF associées à de la GTP. Partis de la clathrine, nous y revenons.

## Entretiens avec Émile Noël



### 12 CLÉS POUR LE MÉDICAMENT

La plupart des médicaments actuels sont d'origine naturelle. Découverts le plus souvent par hasard, certains sont hérités du passé, d'autres sont plus récents. La quête de nouveaux produits toujours plus efficaces et mieux tolérés reste l'un des objectifs de la recherche de pointe.

Code : 2020 215 pages – 75 F



Bon de commande en p. 98

En réalité, la plupart des vésicules observées au microscope dans les cellules ne semblent pas être enveloppées : faut-il en conclure que le phénomène de bourgeonnement que nous avons décrit ne concerne que les vésicules COP ou les vésicules à clathrine ? Bien sûr que non. Cette absence fréquente d'enveloppe est simplement due au fait que l'enveloppe se désagrège rapidement après le bourgeonnement, rendant difficile sa visualisation par les méthodes classiques d'observation. C'est ainsi que, dans l'histoire de la découverte des vésicules, on a souvent supposé que leur formation survenait par un mécanisme différent de celui expliqué ici... jusqu'au moment où un système acellulaire de bourgeonnement était mis au point et permettait de surprendre l'état transitoirement « habillé » de la vésicule.

Ainsi les vésicules qui transportent des protéines du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi sont les dernières en date pour lesquelles on a récemment trouvé une enveloppe. Randy Schekman, de l'Université de Berkeley, L. Orci et leurs collaborateurs respectifs ont montré que, dans ce cas, le rôle de l'ARF est tenu par une molécule analogue et qui déclenche le bourgeonnement. Un autre ensemble de protéines, nommées protéines COP II, remplace le coatomère.

Aujourd'hui il est quasi certain que toutes les cellules à noyau utilisent le même principe de formation des vésicules de transport. Ce système est si efficace qu'il a été conservé lorsque des espèces très simples, unicellulaires, ont évolué et formé des êtres pluricellulaires plus complexes. L'ARF ou une molécule apparentée déclenche la formation de l'enveloppe en captant

de la GTP et en se fixant sur la membrane. Cet initiateur recrute ensuite des composants supplémentaires, qui s'enchaînent en un dôme sphérique. Ainsi une petite partie de la membrane bourgeonne sous la forme d'une vésicule recouverte par une enveloppe. Ultérieurement les molécules de GTP favorisent l'élimination de l'enveloppe, pour laisser la vésicule fusionner avec un organelle cible.

Si l'enveloppe n'est importante que pour le bourgeonnement, pourquoi les cellules en utilisent-elles plusieurs sortes ? Sans doute parce que l'enveloppe sélectionne le contenu des vésicules. Parfois les protéines transportées se trouvent dans la membrane, directement fixées sur l'enveloppe. Parfois la « cargaison » est associée à l'enveloppe par un intermédiaire – un récepteur – qui plonge dans la membrane. L'emploi d'enveloppes différentes permettrait d'« embarquer » différentes cargaisons à partir d'un point de départ unique ou de compartiments différents.

D'autres questions restent ouvertes. On connaît mal, notamment, le mécanisme détaillé de la fixation de l'ARF ou des molécules analogues à la membrane, ou de l'ancrage aux protéines du coatomère. Certains lipides (des molécules de graisse) semblent aider l'ARF à capter le coatomère, et les protéines de transport pourraient participer à l'élaboration de l'enveloppe. Nous aimerions également mieux connaître les activités spécifiques des diverses sous-unités du coatomère. La biologie des vésicules a bien progressé, et il est apparu qu'aucune ville n'est aussi efficace que les cellules pour acheminer ses travailleurs de place en place.

James ROTHMAN dirige le Programme de biochimie et biophysique du Centre de recherche sur le cancer Memorial Sloan-Kettering. Lelio ORCI est directeur du Département de morphologie et professeur d'histologie et de biologie cellulaire à l'Université de Genève.

L. ORCI, B.S. GLICK et J.E. ROTHMAN, *A New Type of Coated Vesicular Carrier That Appears Not to Contain Clathrin : Its Possible Role in Protein Transport within the Golgi Stack*, in *Cell*, vol. 46, n° 2, pp. 171-184, 1986.

M.G. WATERS, T. SERAFINI et J.E. ROTHMAN, «Coatomer» : A Cytosolic Protein Complex Containing Subunits of Non-

*Clathrin-Coated Golgi Transport Vesicles*, in *Nature*, vol. 349, pp. 248-251, 17 janvier 1991.

T. SERAFINI, L. ORCI, M. AMHERDT, M. BRUNNER, R.A. KAHN et J.E. ROTHMAN, *Coated Vesicles*, in *Cell*, vol. 67, n° 2, pp. 239-253, 18 octobre 1991.

J. OSTERMANN, L. ORCI, K. TANI, M. AMHERDT, M. RAVAZZOLA et J.E. ROTHMAN, *Stepwise Assembly of Functionally Active Transport Vesicles*, in *Cell*, vol. 75, n° 5, pp. 1015-1025, 3 décembre 1993.

J.E. ROTHMAN, *Mechanisms of Intracellular Protein Transport*, in *Nature*, vol. 372, pp. 55-63, 3 novembre 1994.



Algorithmes et Optimisation

## La Société de Calcul Mathématique, S.A

**D**es solutions algorithmiques efficaces au service des entreprises, dans tous les domaines :

- optimisation de stocks, de transports, de livraisons,
- mathématiques économiques, bancaires, financières ; algorithmes de codage,
- Calcul scientifique, Calcul Mathématique Assisté par Ordinateur.

La S.C.M. annonce :

Le logiciel de Calcul Mathématique Assisté par Ordinateur : *Simplex-AMP*, conçu par Jean-Michel Drouffe, est maintenant disponible dans sa version de base.

Fonctionnant sur PC équipé de Windows, cet *Assistant Mathématique*

est très simple d'emploi et est doté d'une interface très conviviale. Il réalise les opérations usuelles : définition d'une fonction, dérivations, opérations sur les polynômes, les matrices, trigonométrie, etc., et est doté d'un puissant langage de programmation.

Il peut être utilisé, dans l'enseignement, par les élèves à partir de la seconde et leurs professeurs, et dans l'industrie, par les techniciens et les ingénieurs. C'est à ce jour le seul logiciel satisfaisant aux normes conçues par la S.C.M. dans le cadre des études menées pour *Digital Equipment Corp.* Le logiciel, sous sa version de base, est disponible à un prix très bas : 300 F T.T.C.

**L'***Institut de Calcul Mathématique*, en charge des opérations de recherche fondamentale liées aux activités de la S.C.M., est désireux de nouer des liens

- avec des équipes (industrielles ou universitaires), dans le but d'élaborer des programmes de recherche en commun,
- avec des chercheurs et des étudiants (niveau maîtrise et au-delà), désireux de participer aux programmes en cours ou à venir.

L'I.C.M. publie tous les trois mois la "Lettre de l'I.C.M.", forum d'in-

formation et de débats sur les orientations des mathématiques et leurs débouchés, destiné aux étudiants (niveau maîtrise et au-delà) et aux chercheurs. Au sommaire du numéro 2, daté avril 96 :

- Un dossier sur l'emploi en mathématiques, par Bernard Beauzamy,
- Thésard CIFRE, par Thierry Beley,
- L'emploi des jeunes en sciences : un point de vue «exotique», par Régis Caboz,
- L'enseignement de l'informatique, par Maurice Nivat.

Abonnement 100 F pour 4 numéros.

Tél : 47 07 52 92  
Fax : 48 07 83 97

Institut de Calcul Mathématique



I.C.M. et S.C.M. :  
37, rue Tournefort, 75005 Paris