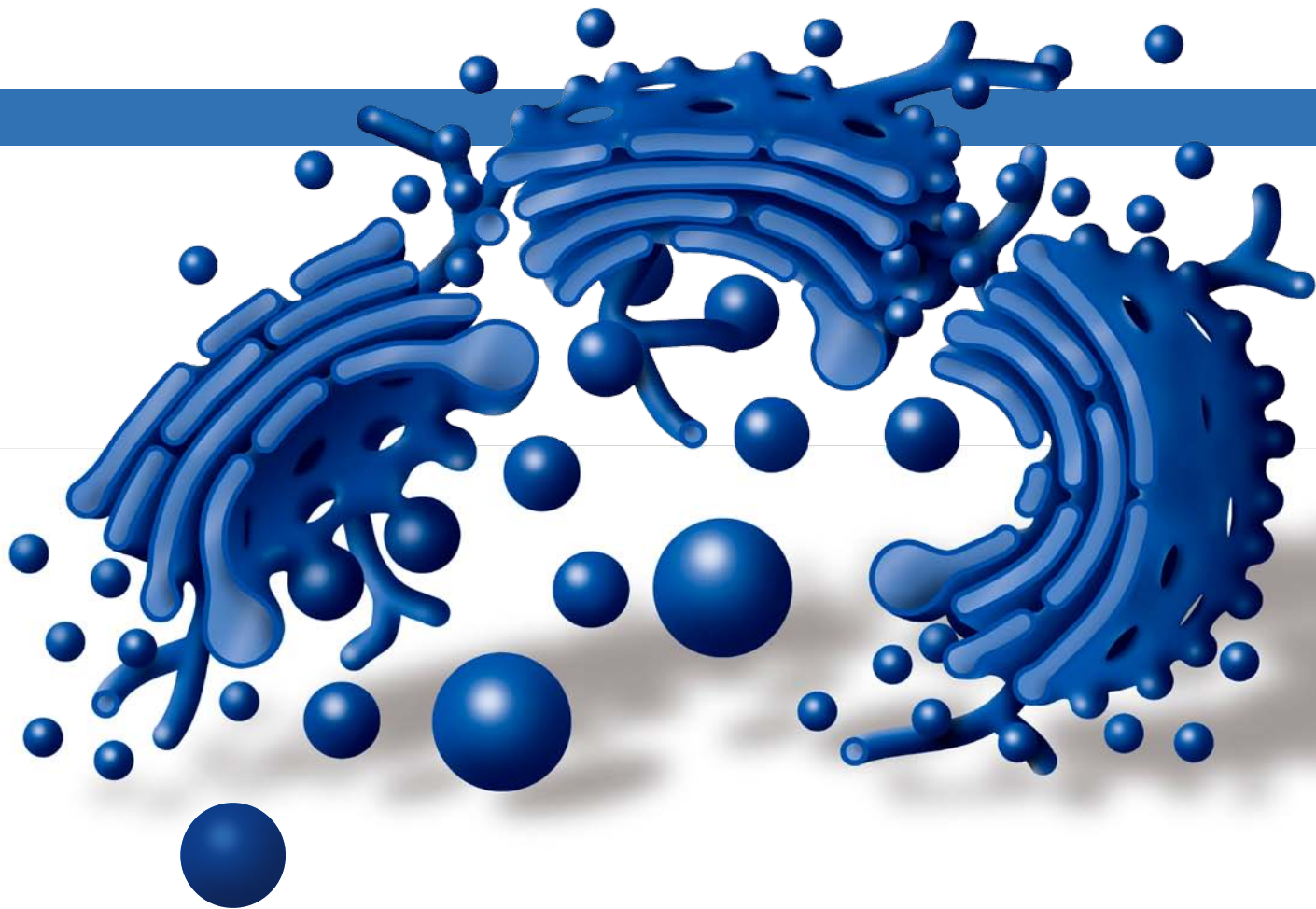




endroit et au bon moment ? Ils ont alors eu une idée, qui s'est révélée correcte : ils avaient remarqué, entre les compartiments, plein de petits objets sphériques, de 50 nanomètres de diamètre environ, qu'ils avaient nommés vésicules. Ils ont émis l'hypothèse que ces vésicules véhiculent les protéines. Palade a imaginé que ces vésicules se formaient en bourgeonnant à la membrane d'un compartiment, puis voyageaient jusqu'à une autre membrane à laquelle elles se joignaient alors, combinant leur membrane à celle-ci – un processus qu'il a nommé fusion membranaire.

PLS

C'est alors que vous, Randy Schekman et James Rothman, êtes entrés en scène, par deux approches distinctes.

RANDY SCHEKMAN : En effet, Palade avait dessiné la carte de la voie de sécrétion des protéines, mais il fallait encore comprendre ce qui, mécaniquement, permettait ce processus. J'ai donc décidé d'utiliser la génétique pour disséquer cette voie et aller à la pêche aux gènes impliqués. J'avais travaillé dans le laboratoire d'Arthur Kornberg (prix Nobel en 1959), qui avait mis en évidence le mécanisme de réplication de l'ADN, et j'y avais acquis la conviction qu'une approche génétique pouvait aider à comprendre les processus complexes. En 1976, à Berkeley,

j'ai commencé à travailler sur la voie de sécrétion des protéines de la levure du boulanger. Au microscope, on distinguait des vésicules dans le bourgeon de la levure – l'excroissance qui devient une cellule fille après la division cellulaire. Ces vésicules sécrétaient peut-être des protéines ? Nous avons montré que non seulement c'était bien le cas, mais qu'elles fournissaient de la membrane au bourgeon cellulaire. Le système paraissait donc propice à l'étude du trafic vésiculaire.

PLS

Comment va-t-on « à la pêche » aux gènes impliqués dans le transport vésiculaire ?

R.S. : En recherchant des mutations qui perturbent la croissance de la surface cellulaire. Nous nous sommes dit que toute mutation qui interromprait cette croissance tuerait la cellule. Alors, avec Peter Novick, un de mes premiers étudiants, nous avons décidé de rechercher des mutations létales pour la cellule et sensibles à la température. Après quelques essais, Peter a compris qu'il serait possible d'obtenir des mutations qui bloqueraient la sécrétion simplement en analysant un ensemble de clones présentant des mutations aléatoires : il suffisait d'exposer des cultures de levures à un agent chimique favorisant les mutations génétiques, de cultiver chaque cellule et d'analyser les clones obtenus.

Un jour, Peter m'appelle au microscope électronique. Nous n'avions jamais vu une telle cellule : à une température restrictive où elle aurait dû mourir, elle était comme constipée de vésicules ! Remis à une température permissive, ce mutant a libéré le contenu des vésicules à la surface cellulaire. Nous avons trouvé une mutation qui perturbait la sécrétion en fonction de la température. Nous avons nommé *sec1* le gène muté.

PLS

Il « suffisait » donc de rechercher les mutations qui « constipaient » les cellules ?

R.S. : C'est ce que nous pensions, mais nous n'avons trouvé que peu de mutants impliqués, jusqu'à ce que Peter remarque qu'à la température restrictive, ces cellules ne grossissaient plus, mais produisaient toujours des vésicules. Nous avons supposé que la densité des cellules augmentait à cette température et qu'il serait donc possible de les récupérer en les centrifugeant dans un gradient de densité. C'est ce que nous avons fait. En n'analysant plus que ces cellules denses, Peter a identifié, dans l'année qui a suivi, une centaine de mutations qui perturbaient la sécrétion en fonction de la température. Ces mutations touchaient 23 gènes, que nous avons nommés *sec1* à *sec23*. Aujourd'hui, on sait que la voie de sécrétion fait très probablement intervenir une centaine de gènes, impliqués à toutes les étapes.

PLS

James Rothman, en quoi consistait votre approche et comment l'avez-vous choisie ?

J. R. : Le transport de protéines intervient dans nombre de processus cellulaires : croissance, division cellulaire, régulation de l'insuline, métabolisme, immunité, communication entre neurones... Face à cette complexité, il est naturel d'imaginer qu'il y a autant de mécanismes que de fonctions. Mais l'idée la plus simple est de dire qu'il n'y a qu'un seul mécanisme pour tous ces processus. Cela peut paraître simpliste, surtout pour un biologiste, mais je venais de la physique ! J'ai grandi à une époque où l'on entendait beaucoup parler de physique avec la compétition des États-Unis et de l'Union soviétique engendrée par la guerre froide. Je me suis mis à penser le monde en physicien et à étudier la physique. Et lorsque je me suis intéressé à la biologie, je l'ai regardée à la façon d'un physicien.

La physique de la fusion membranaire n'est pas un problème. Une membrane biologique est constituée de deux couches de lipides, et fusionner deux membranes n'est pas plus compliqué que réunir deux bulles de savon. La question était : comment la biologie exploite-t-elle la physique pour libérer le bon chargement à la bonne place au bon moment ? S'il existait un mécanisme commun à tous les transports vésiculaires, il serait peut-être plus facile de le mettre en évidence dans un système biologique simplifié. Avec Erik Fries, un postdoctorant suédois, nous avons donc décidé de travailler hors cellule, avec des extraits de cellules de mammifères.

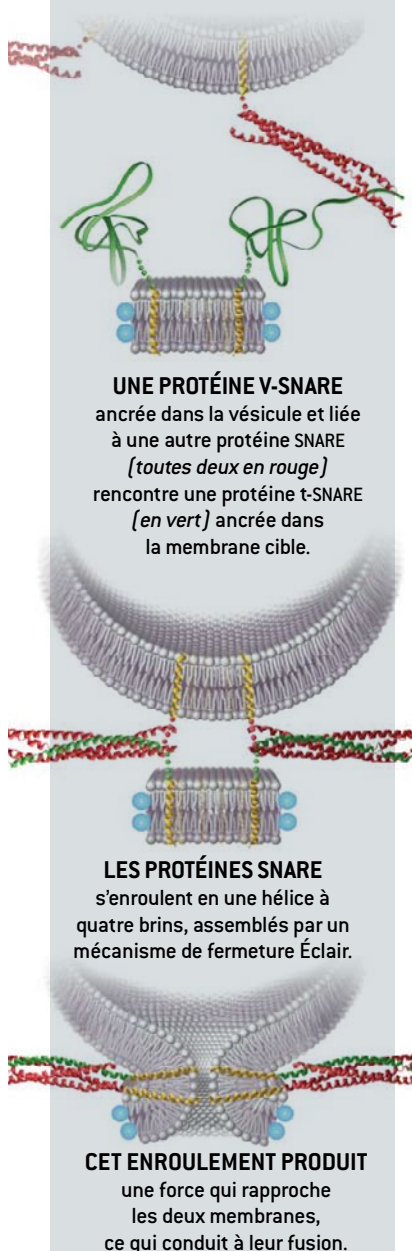
PLS

Comment s'y retrouver dans un tel mélange ?

J. R. : L'idée clé a été de suivre une protéine que sécrètent les cellules infectées par le virus de la stomatite vésiculaire : la glycoprotéine VSV-G. Sur son chemin vers la surface cellulaire, cette protéine est glycosylée : des molécules de sucre se forment sur elle par l'ajout progressif de résidus de sucre le long de la voie de sécrétion. Nous avons donc mesuré l'élaboration de ces sucres dans notre système en examinant si de nouveaux résidus se liaient à la protéine. L'ajout de chaque résidu étant spécifique d'un compartiment de la voie de sécrétion, en trouver de nouveaux sur la protéine signifiait que la protéine s'était déplacée d'un compartiment à un autre. Après quelque temps,

La fusion membranaire

Aujourd'hui, on connaît la structure tridimensionnelle des protéines qui régissent la fusion d'une vésicule avec une membrane cible, et le mécanisme qui déclenche cette fusion.



enfin, en mai 1979, nous avons observé que la glycoprotéine était bien modifiée.

PLS

Comment avez-vous exploité ce système ?

J. R. : Nous l'avons d'abord perfectionné, ce qui nous a permis de montrer que certains éléments de la cellule étaient indispensables au transport vésiculaire, notamment le liquide intracellulaire ou cytosol. Nous avons alors testé l'effet d'inhibiteurs d'enzymes du cytosol. L'un d'eux, le NEM, a entraîné une accumulation de vésicules. Il existait donc un facteur sensible au NEM qui permettait la fusion en l'absence de NEM. Nous avons réussi à purifier ce facteur et l'avons nommé NSF (*NEM Sensitive Factor*). Lorsqu'on l'ajoutait à notre système *in vitro*, NSF reconstituait le transport et la fusion membranaire. La protéine jouait donc un rôle dans la fusion membranaire, et nous pourrions l'utiliser comme appât pour, nous aussi, aller à la pêche – à ses partenaires. Nous avons ainsi isolé une protéine du cytosol qui joue le rôle d'intermédiaire entre NSF et la membrane, que nous avons nommée SNAP (*Soluble NSF Attachment Protein*).

PLS

D'un côté, les 23 gènes *sec* identifiés chez la levure, de l'autre, les protéines NSF et SNAP isolées dans des cellules de mammifères. Comment avez-vous réuni les deux histoires ?

R. S. : Au début des années 1990, les gènes de la levure impliqués dans la voie de sécrétion étaient connus. De leur côté, J. Rothman et ses collègues avaient séquencé les gènes codant les protéines NSF et SNAP chez les mammifères. En comparant les séquences, ils ont découvert que le gène codant NSF était très semblable à *sec18*, et celui codant SNAP, très similaire à *sec17*. À ce point, nos deux chemins ont convergé. Cette convergence était fondamentale, car elle signifiait que les acteurs du trafic intracellulaire sont conservés de la levure aux mammifères.

PLS

Les acteurs identifiés expliquaient-ils la spécificité des voies de sécrétion ?

J. R. : Ils ont permis de préciser les choses. Il est apparu que NSF et SNAP intervenaient dans tous