

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.

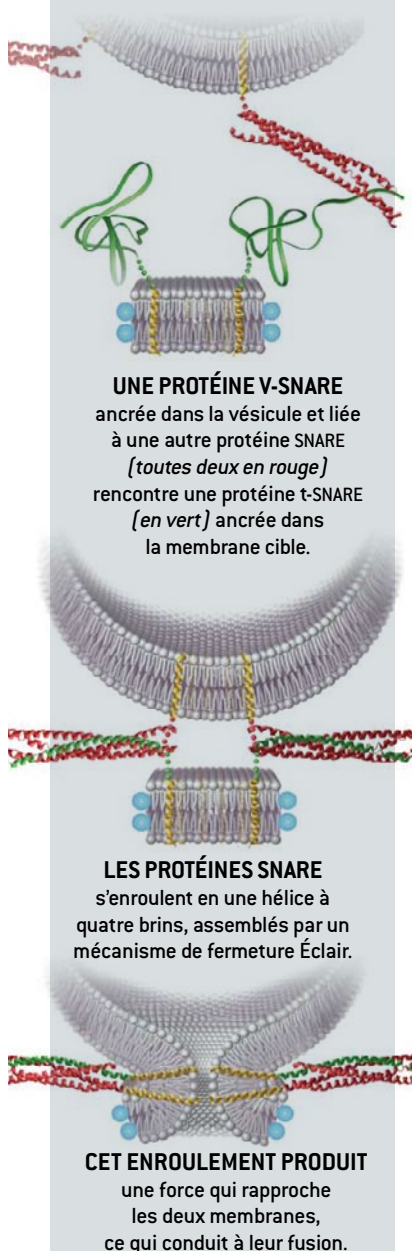
PLS

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

les processus de fusion membranaire connus à cette époque. Les deux protéines ne portaient donc pas la spécificité, et des récepteurs de SNAP sur la membrane des vésicules devaient remplir ce rôle. Nous sommes à nouveau partis à la pêche pour isoler ces protéines, que nous avons nommées SNARE, à partir d'un extrait de cerveau bovin.

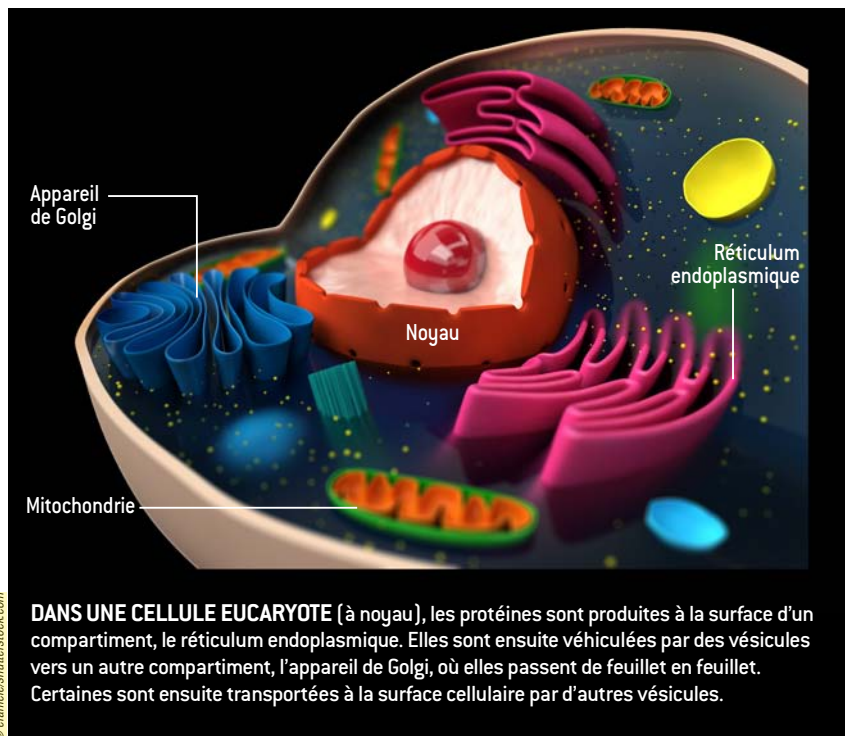
Nous avons utilisé des extraits de cerveau car la concentration de SNARE y était dix fois plus importante que dans tout autre tissu de l'organisme. Nous avons ainsi récolté trois protéines... déjà bien connues des neuroscientifiques : la syntaxine, SNAP-25 et VAMP faisaient partie des acteurs de la transmission synaptique – la communication entre les neurones. Nous avons montré que ces trois protéines forment un complexe où l'une est localisée dans les vésicules synaptiques, tandis qu'une autre réside dans la membrane du neurone.

Nous avons alors imaginé le scénario suivant : une vésicule s'accroche et fusionne avec une membrane cible lorsqu'une protéine v-SNARE de la vésicule interagit avec une protéine t-SNARE de la membrane cible. Chaque vésicule et chaque membrane partenaire auraient leurs propres et uniques protéines v-SNARE et t-SNARE, qui constitueraient des partenaires spécifiques et démarreraient la fusion membranaire. Ce mécanisme serait une source majeure de spécificité de la fusion membranaire. Cette hypothèse a été validée quelques années plus tard, quand nous avons montré *in vitro*, avec des membranes artificielles, que ces trois protéines sont nécessaires et suffisantes pour la fusion membranaire.

PLS

Thomas Südhof, vos travaux sur le transport vésiculaire dans les neurones débutent à ce moment. Pourquoi ce sujet ?

THOMAS SÜDHOF : Le cerveau ressemble à un puissant ordinateur, constitué de circuits neuronaux dont les unités de base sont les synapses, les jonctions permettant la transmission de l'information d'un neurone à un autre. Les synapses fonctionnent toutes sur le même principe : un potentiel électrique déclenche l'ouverture de canaux de calcium dans la zone synaptique du premier neurone ; du calcium pénètre dans la cellule et déclenche à son tour la libération, dans la synapse, de neurotransmetteurs, des molécules qui se lient à des récepteurs à la surface du second neurone, y déclenchant ainsi un



DANS UNE CELLULE EUCARYOTE (à noyau), les protéines sont produites à la surface d'un compartiment, le réticulum endoplasmique. Elles sont ensuite véhiculées par des vésicules vers un autre compartiment, l'appareil de Golgi, où elles passent de feuillet en feuillet. Certaines sont ensuite transportées à la surface cellulaire par d'autres vésicules.

potentiel d'action. Ce qui est remarquable dans la transmission synaptique, c'est sa rapidité : il suffit de quelques millisecondes. La clé de cette rapidité devait se trouver dans l'étape la plus complexe du processus : la transformation du signal calcique en une fusion des vésicules synaptiques, contenant les neurotransmetteurs, avec la surface cellulaire. D'où mon intérêt pour cette étape. J'ai recherché les mécanismes qui assuraient cette fusion rapide.

PLS

Quelle approche avez-vous choisie ?

T. S. : D'une part, nous avons étudié la fusion des vésicules synaptiques elles-mêmes, ce qui nous a permis d'isoler un régulateur essentiel de l'activité de la syntaxine, une des protéines du complexe SNARE de ces vésicules. D'autre part, nous avons caractérisé de façon systématique les protéines des vésicules synaptiques et étudié leur fonction chez la souris, dans des neurones mutants où les gènes associés ne sont plus fonctionnels. Cette approche a conduit notamment à la découverte de deux protéines impliquées dans la régulation temporelle de la fusion membranaire, la synaptotagmine et la complexine, qui sont en quelque

sorte l'accélérateur et le frein de la fusion. La synaptotagmine, située sur les vésicules, capte le calcium, ce qui déclenche la libération des neurotransmetteurs. Liée au complexe SNARE, la complexine est une sorte de pince qui empêche la vésicule de fusionner tant que du calcium ne s'est pas lié à la synaptotagmine.

PLS

Aujourd'hui, comment décririez-vous la fusion des vésicules synaptiques et que reste-t-il à comprendre ?

T. S. : Ces dernières années, nous avons complété le schéma en élucidant le mécanisme qui permet au neurone présynaptique de ne faire entrer du calcium que là où des vésicules synaptiques sont amarrées : un complexe de protéines orchestre l'amarrage des vésicules près de canaux calciques. L'ensemble des protéines intervenant dans la fusion membranaire ressemble ainsi de plus en plus à une nanomachine dont le rôle serait de déclencher une libération rapide des neurotransmetteurs. Il s'agit maintenant de comprendre comment cette nanomachine fonctionne durant la « vie » d'une synapse...