

## **L**a bréfeldine A : inhibition « non compétitive » de l'activité d'échange sur une petite protéine G

La voie biosynthétique/sécrétoire est constituée d'une succession de compartiments membranaires spécialisés, notamment dans la maturation et le tri des protéines (*m/s* 1992, n° 4, 326). Dans toutes les cellules eucaryotes, cette voie contrôle la sécrétion des protéines mais aussi la localisation des protéines membranaires, ainsi que celle des enzymes des différents compartiments (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, lysosomes...). Dans le modèle classique, les protéines sont transportées d'un compartiment à un autre par un flux de vésicules phospholipidiques. Les vésicules contenant les molécules à transporter bourgeonnent à partir d'un compartiment donneur, migrent puis fusionnent avec le compartiment accepteur et ainsi de suite d'un compartiment à un autre [1]. Des études biochimiques et génétiques ont montré l'importance de complexes polypeptidiques appelés manteaux protéiques dans ces processus de transport. La translocation de ces complexes polypeptidiques cytosoliques, au niveau de la membrane du compartiment donneur, est un processus très contrôlé. En s'associant à la membrane du compartiment donneur, les manteaux permettent la formation des intermédiaires de transport vésiculaires et participent au tri des protéines à transporter [2].

La nature du manteau protéique diffère selon les vésicules. Néanmoins, quelle que soit la nature protéique du manteau, l'assemblage des manteaux sur les vésicules est contrôlé par des protéines « interrupteur » de la famille des petites protéines G parmi lesquelles se trouve la petite protéine G ARF (pour *ADP-ribosylation factor*). Cinq protéines ARF humaines et trois protéines ARF de levure ont été identifiées. Les différentes protéines ARF présentent notamment des localisations cellulaires différentes. Comme

toutes les petites protéines G, ARF existe sous deux formes : une forme « inactive » liée au GDP et une forme « activée » liée au GTP. Seule la forme activée de ARF permet le recrutement des protéines du manteau sur les vésicules [2]. L'activation de ARF (correspondant à la dissociation du GDP qui lui est associé, suivie de la fixation de GTP) est assurée *in vivo* par des protéines appelées facteurs d'échange GDP-GTP (*m/s* 1997, n° 5, 731-4).

### **Bréfeldine A et facteurs d'échange pour ARF**

La bréfeldine A (ou BFA) est une molécule très utilisée en biologie cellulaire. Il s'agit d'un composé lipidique d'origine fongique qui bloque de façon spécifique la sécrétion des protéines dans les cellules animales, celles des végétaux supérieurs et chez la levure *S. cerevisiae* [3-6]. Le traitement des cellules par la BFA entraîne une perturbation de la structure des compartiments membranaires et en particulier de l'appareil de Golgi qui est le site majeur de tri des protéines dans la voie biosynthétique/sécrétoire [3]. Au niveau moléculaire, le traitement des cellules par la BFA entraîne très rapidement la redistribution vers le cytosol de nombreuses protéines normalement associées aux membranes. Après quelques secondes de traitement, l'association aux membranes de différents types de protéines de manteaux est rompue [7-9, 24]. En fait, la protéine ARF1 est l'une des premières protéines à être redistribuée vers le cytosol en réponse à un traitement par la BFA [10].

L'hypothèse d'un lien entre BFA et ARF a été renforcée lorsqu'en 1992, deux équipes ont montré indépendamment que l'activité d'échange sur ARF associée à des membranes golgiennes était inhibée par la BFA, faisant ainsi de l'activation de ARF une cible de la BFA [11, 12]. Compte tenu

des données disponibles, plusieurs modèles d'action de la BFA étaient alors envisageables. On pouvait supposer que les effets multiples du traitement des cellules à la BFA étaient dus à la seule inhibition des facteurs d'échange pour ARF, cette inhibition pouvant être directe ou indirecte. Il était possible aussi que la multiplicité des effets cellulaires de la BFA reflète la multiplicité des cibles de cette molécule, cibles parmi lesquelles on trouvait les facteurs d'échange.

Une combinaison d'approches génétiques chez la levure et d'approches biochimiques a récemment permis de déterminer quel modèle d'action prévalait et par quel mécanisme moléculaire la BFA agissait.

#### • Les protéines à domaine Sec7 : facteurs d'échange pour ARF et cibles de la BFA

En 1996, différents facteurs d'échange pour ARF ont été identifiés à la fois chez la levure et dans les cellules animales [13-15]. Toutes ces protéines possèdent un domaine d'environ 200 acides aminés appelé domaine Sec7. Il a en fait été établi que ce domaine constitue le domaine catalytique d'échange GDP-GTP sur ARF, faisant ainsi de l'ensemble des protéines à domaine Sec7 des facteurs d'échange pour ARF [14].

Depuis 1996, de nombreuses protéines à domaine Sec7 ont été identifiées. Sur la base d'homologie de séquence primaire, on peut les classer en différentes familles (*figure 1*). Les familles des « grandes protéines à domaine Sec7 », telles que Gea et Sec7, comprennent des membres à la fois chez la levure *S. cerevisiae* et chez les eucaryotes supérieurs alors que les familles ARNO et EFA6, correspondant à des protéines d'environ 50 à 70 kDa, sont spécifiques des eucaryotes supérieurs. Le seul domaine d'homologie entre les différentes

familles correspond au domaine Sec7. Les domaines Sec7 des différentes familles ne sont pas strictement identiques puisqu'ils présentent 30 % à 40 % d'identité entre eux.

Il existe une corrélation étroite entre la sensibilité des cellules de levure à la BFA et le niveau d'expression des protéines Gea1p et Sec7p [16]. L'effet positif du surdosage des deux protéines est au moins additif, suggérant que les fonctions de Sec7p et Gea1/2p sont toutes deux cibles de la BFA chez la levure. L'activité d'échange associée à la fraction partiellement purifiée de Gea1p est inhibée par la BFA [13], indiquant que ce facteur d'échange pour ARF, ou une protéine associée à celui-ci, est une cible de la BFA. Il a aussi été établi que l'activité de la protéine p200 (ou GEP1, homologue bovin de Sec7p) purifiée est sensible à la BFA et donc contient intrinsèquement la capacité d'être inhibée par la molécule [17]. Or, le seul domaine d'homologie entre Gea1/2p et Sec7p est le domaine Sec7. L'hypothèse selon laquelle le domaine Sec7 de Sec7p et de Gea1p pourrait être responsable de la sensibilité à la BFA de ces protéines a donc été émise. Néanmoins, la protéine humaine recombinante ARNO purifiée à homogénéité présente une activité d'échange sur ARF insensible à la BFA [14]. Ces observations suggèrent que les différentes familles de protéines à domaine Sec7 se distinguent non seulement par la taille et les homologies de séquence mais aussi par leur sensibilité intrinsèque à la BFA. Il apparaissait alors possible que les différents domaines Sec7, qui ne présentent que 35 % d'identité entre eux en moyenne, n'aient pas tous la même sensibilité à la BFA.

- *Le domaine Sec7 est un déterminant majeur de la sensibilité à la BFA des protéines Gea1/2p et de Sec7p*

Pour tester cette hypothèse, des protéines chimériques dans lesquelles le domaine Sec7 des protéines Gea1p et Sec7p a été remplacé par le domaine Sec7 d'ARNO ont été construites. Les protéines chimériques sont parfaitement fonctionnelles *in vivo* chez la levure indiquant que le domaine Sec7 est un module capable de fonctionner dans différents contextes protéiques. Dotées du domaine Sec7 d'ARNO, les

protéines chimériques permettent aux cellules de levure de mieux résister aux effets de la BFA sur la croissance et sur la sécrétion des protéines. Le domaine Sec7 est donc un déterminant majeur de la sensibilité à la BFA des protéines Gea1/2p et Sec7p et le domaine Sec7 d'ARNO est résistant aux effets du produit non seulement *in vitro* mais aussi *in vivo* chez la levure [14, 16].

Une souche de levure chez laquelle à la fois la seule source de protéines Gea et la seule source de protéine Sec7 correspond à des formes résistantes à la BFA des protéines Gea et Sec7, ne présente presque plus aucun défaut de croissance ni de transport des protéines même en présence de fortes concentrations de

BFA [16]. Cela indique que, chez *S. cerevisiae* au moins, les protéines Gea1/2p et Sec7p sont les cibles majeures de la BFA dans la voie biosynthétique/sécrétoire.

#### Certains résidus du domaine Sec7 déterminent la sensibilité à la BFA *in vivo* et *in vitro*

Afin de déterminer quels résidus de Gea1p sont importants pour la sensibilité à la BFA, une mutagenèse aléatoire du gène *GEA1*, suivie d'une sélection des cellules de levure présentant une meilleure croissance en présence de BFA que les cellules portant le gène *GEA1* sauvage, a été réalisée. Une analyse systématique des

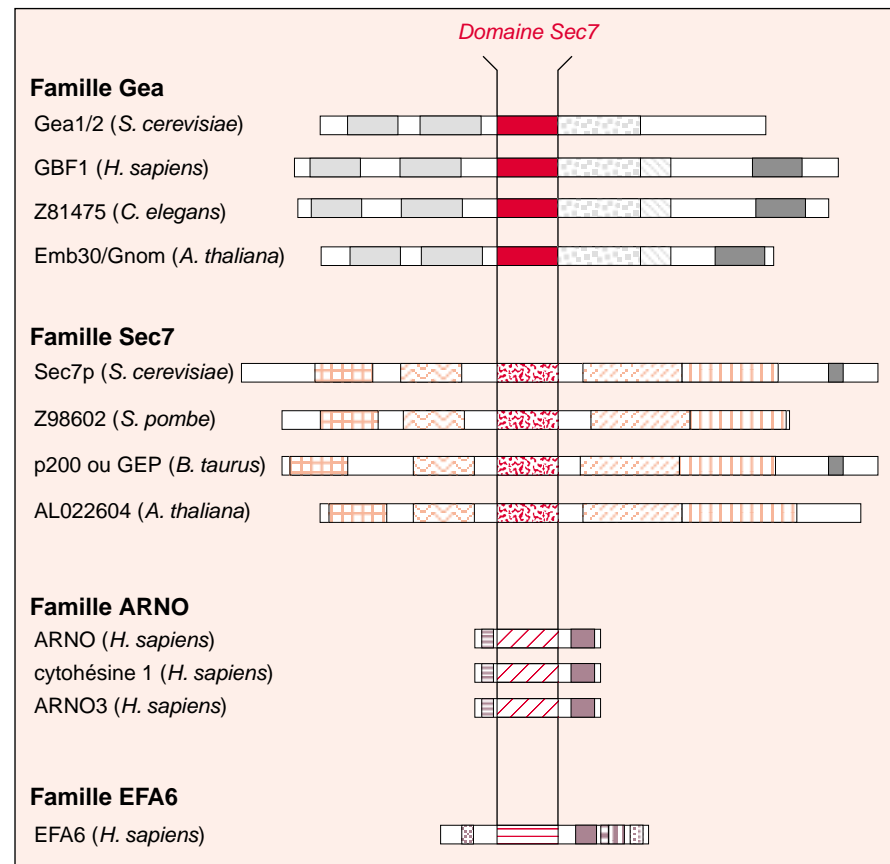


Figure 1. **Les différentes familles de protéines à domaine Sec7.** La présence d'une région d'homologie entre les différents membres au sein d'une même famille est indiquée par un motif graphique identique. Les différentes familles diffèrent par leur séquence mais aussi par la taille moyenne de leurs membres : famille Gea : 165 à 208 kDa ; famille Sec7 : 200 à 230 kDa ; famille ARNO : ~ 50 kDa et EFA6 : ~ 70 kDa. Les familles Gea et Sec7 comprennent à la fois des membres chez la levure *S. cerevisiae* et chez les eucaryotes supérieurs, alors que les familles ARNO et EFA6 sont spécifiques des eucaryotes supérieurs.

mutants a permis: (1) de confirmer l'importance du domaine Sec7 pour la sensibilité à la BFA car tous les mutants sélectionnés contenaient au moins une mutation dans le domaine Sec7; (2) de mettre en évidence une région du domaine Sec7 fréquemment mutée dans les versions de *GEA1* induisant une résistance à la BFA, suggérant que cette région du domaine Sec7 est particulièrement importante pour la réponse au produit ([16] et *figure 2*). L'effet direct des mutations au sein du domaine Sec7 a été établi car le domaine Sec7 purifié à partir des mutants présente une activité d'échange *in vitro* moins sensible à la BFA que le domaine Sec7 sauvage [16, 19].

En conclusion, en introduisant des mutations ponctuelles au sein du domaine Sec7, on peut donc rendre plus résistante au produit une protéine qui y est naturellement sensible. De façon intéressante, dans la région d'environ 35 acides aminés fréquemment mutée, se trouvent de nombreux résidus qui diffèrent entre les protéines résistantes à la BFA *in vitro* (telles qu'ARNO, cytohésine 1) et les protéines sensibles (telles que Sec7p, p200 ou Geal/2p) (*figure 2*). Sur la

base de cette observation, Bruno Antony et Sylviane Robineau à Sophia-Antipolis (Valbonne, France) ont construit un domaine Sec7 d'ARNO dans lequel deux résidus (les résidus F190 et A191), variant entre les familles résistantes et sensibles, ont été remplacés respectivement par les résidus tyrosine et sérine présents dans les protéines naturellement sensibles telles que Gealp et Sec7p. La version mutée du domaine Sec7 d'ARNO présente *in vitro* une activité d'échange sur ARF plus sensible à la BFA que la version sauvage. En fait, le remplacement des résidus «FA» par les résidus «YS» convertit la protéine ARNO normalement résistante à la BFA en une protéine sensible et ce, à la fois *in vivo* et *in vitro*. Des analyses complémentaires ont montré que le résidu équivalent au résidu F190 d'ARNO est, à lui seul, un déterminant important de la sensibilité à la BFA de l'activité d'échange sur ARF. Ainsi, selon que ce résidu est une phénylalanine ou une tyrosine, une protéine à domaine Sec7 peut être convertie en une protéine sensible ou non à la BFA. Parallèlement, l'équipe de Martha Vaughan a montré que le domaine Sec7 isolé de la protéine

Sec7p est sensible à la BFA *in vitro* [18]. En construisant des domaines Sec7 chimériques provenant de la protéine Sec7p (sensible à la BFA) et de la protéine cytohésine 1 appartenant à la famille ARNO (résistante au produit), cette équipe a établi qu'*in vitro*, une région de 10 acides aminés du domaine Sec7, comprise dans la zone fréquemment mutée identifiée par l'approche précédente de mutagenèse aléatoire, est importante pour la sensibilité à la BFA [19]. Dans cette région, la mutation de deux résidus (S198 et P208 dans ARNO) différant entre Sec7p et cytohésine 1 (et de façon plus générale entre familles sensibles et résistantes) convertit le domaine Sec7 de cytohésine 1 en un domaine sensible à la BFA *in vitro*. Ces études ont donc établi l'importance de la partie carboxyterminale du domaine Sec7 pour la réponse à la BFA et identifié certains résidus cruciaux pour cette réponse.

### La BFA inhibe la réaction d'échange en stabilisant un complexe abortif domaine Sec7-ARF-GDP

D'après les données cristallographiques, les résidus du domaine Sec7 identifiés comme importants pour la sensibilité à la BFA se trouvent au cœur du site d'interaction entre le domaine Sec7 et ARF [20, 21]. Une des hypothèses était donc que la BFA puisse agir comme un inhibiteur compétitif qui empêcherait l'interaction du domaine Sec7 avec ARF par encombrement stérique au niveau du site de liaison d'ARF. Les prédictions de ce modèle d'inhibition compétitive classique sont que: (1) l'augmentation de la concentration en substrat a pour conséquence de diminuer l'effet de l'inhibiteur et (2) en présence de BFA, l'association entre ARF et le domaine Sec7 est défavorisée. Or, des expériences de cinétique enzymatique ont montré qu'une augmentation de la concentration de ARF (le substrat) augmente l'effet inhibiteur de la BFA [16, 22]. De plus, la présence de BFA, loin de défavoriser la quantité de complexe entre le domaine Sec7 et ARF, stabilise un complexe entre ces deux protéines [16]. Il a été établi que le complexe entre ARF et le domaine Sec7 accumulé en présence

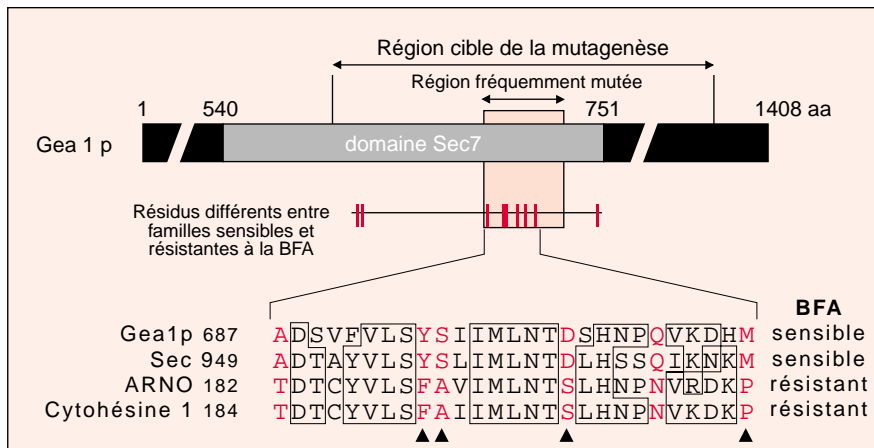


Figure 2. **Identification des résidus du domaine Sec7 impliqués dans la réponse à la bréfeldine A.** La protéine Gealp et son domaine Sec7 sont représentés schématiquement. La région de GEA1 ayant subi la mutagenèse est indiquée. La région d'environ 35 acides aminés fréquemment mutée chez les mutants résistants à la BFA est indiquée par un fond grisé. Cette région contient de nombreux résidus qui diffèrent dans les protéines sensibles et les protéines résistantes à la BFA (indiqués par des bâtons rouges). Dans l'alignement de séquence de cette sous-région du domaine Sec7, les résidus différenciant les familles résistantes et sensibles à la BFA sont indiqués en rouge. Les flèches indiquent les résidus identifiés comme importants pour la réponse à la BFA [16, 19]; aa: acides aminés.

de BFA contient du GDP. Ces observations ont permis de conclure que la BFA inhibe la réaction d'échange en stabilisant un complexe abortif ARF-GDP-domaine Sec7, qui est un des premiers intermédiaires de la réaction d'échange ([16] et *figure 3*). Ce type d'inhibition, dans laquelle la cible de la molécule est un complexe entre le substrat et l'enzyme, est appelé inhibition incompétitive.

Cette découverte inattendue pourrait avoir de profondes implications sur le développement des stratégies de recherche de molécules bloquant différents processus biologiques [23]. Elle montre en effet qu'il existe une alternative à l'approche évidente consistant à rechercher des composés exerçant leurs effets inhibiteurs en mimant le substrat de la réaction. De plus, l'analyse détaillée des cibles de la BFA a montré qu'un inhibiteur non compétitif peut n'exercer ses effets que sur certains membres d'une famille de protéines ayant toutes le même type de substrat et peut donc présenter une spécificité d'action très stricte.

## Conclusions

Un ensemble d'études combinant des approches de biologie cellulaire, des approches génétiques chez l'organisme modèle qu'est la levure *S. cerevisiae* et des approches biochimiques a

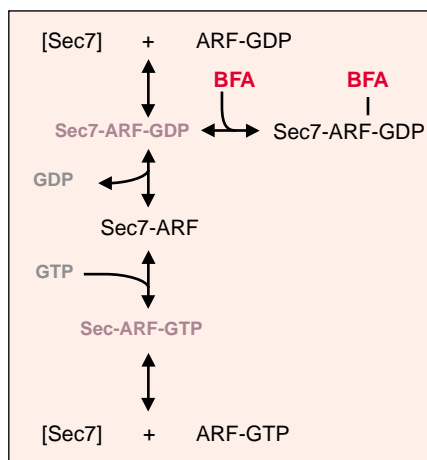


Figure 3. **Mécanisme d'action de la brefeldine A.** Les principales étapes de la réaction d'échange sur ARF sont indiquées. Les intermédiaires de réaction instables sont indiqués en bistre.

permis d'identifier les cibles de la brefeldine A. Or, la BFA est la première molécule identifiée capable d'inhiber l'activité d'échange sur une petite protéine G. Le mécanisme d'inhibition non compétitive est un mécanisme inattendu qui conduit à l'accumulation d'un complexe abortif. La résolution cristallographique de ce complexe abortif pourrait apporter de précieuses informations pour la compréhension des mécanismes de la réaction d'échange GDP-GTP.

Il a été proposé que le concept de piégeage d'un tel complexe abortif puisse servir de plate-forme pour la recherche de nouvelles molécules inhibitrices [23] ■

## RÉFÉRENCES

- Rothman JE, Wieland FT. Protein sorting by transport vesicles. *Science* 1996; 272: 227-34.
- Springer S, Spang A, Schekman R. A primer on vesicle budding. *Cell* 1999; 97: 145-8.
- Pauloin A, Bréfeldine A, protéines-G et transports membranaires golgiens. *Med Sci* 1993; 9: 917-25.
- Vogel JP, Lee JN, Kirsch DR, Rose MD, Sztul ES. Brefeldin A causes a defect in secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1993; 268: 3040-3.
- Graham TR, Scott PA, Emr SD. Brefeldin A reversibly blocks early but not late protein transport steps in the yeast secretory pathway. *EMBO J* 1993; 12: 869-77.
- Satiat-Jeunemaitre B, Cole L, Bourett T, Howard R, Hawes C. Brefeldin A effects in plant and fungal cells: something new about vesicle trafficking? *J Microsc* 1996; 181: 162-77.
- Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J, Bloom GS, Kreis TE, Klausner RD. Dissociation of a 110-kD peripheral membrane protein from the Golgi apparatus is an early event in brefeldin A action. *J Cell Biol* 1990; 111: 2295-306.
- Robinson MS, Kreis TE. Recruitment of coat proteins onto Golgi membranes in intact and permeabilized cells: effects of brefeldin A and G protein activators. *Cell* 1992; 69: 129-38.
- Ooi CE, Dell'Angelica EC, Bonifacino JS. ADP-Ribosylation factor 1 (ARF1) regulates recruitment of the AP-3 adaptor complex to membranes. *J Cell Biol* 1998; 142: 391-402.
- Donaldson JG, Kahn RA, Lippincott-Schwartz J, Klausner RD. Binding of ARF and beta-COP to Golgi membranes: possible regulation by a trimeric G protein. *Science* 1991; 254: 1197-9.
- Donaldson JG, Finazzi D, Klausner RD. Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalyzed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature* 1992; 360: 350-2.
- Helms JB, Rothman JE. Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature* 1992; 360: 352-4.
- Peyroche A, Paris S, Jackson CL. Nucleotide exchange on ARF mediated by yeast Geal protein. *Nature* 1996; 384: 479-81.
- Chardin P, Paris S, Antony B, et al. A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature* 1996; 384: 481-4.
- Morinaga N, Tsai SC, Moss J, Vaughan M. Isolation of a brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor (ARF) 1 and ARF3 that contains a Sec7-like domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 12856-60.
- Peyroche A, Antony B, Robineau S, Acker J, Cherhills J, Jackson CL. Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol Cell* 1999; 3: 275-85.
- Morinaga N, Moss J, Vaughan M. Cloning and expression of a cDNA encoding a bovine brain brefeldin A-sensitive guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 12926-31.
- Sata M, Donaldson JG, Moss J, Vaughan M. Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange activity of Sec7 domain from yeast Sec7 with yeast and mammalian ADP-ribosylation factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4204-8.
- Sata M, Moss J, Vaughan M. Structural basis for the inhibitory effect of brefeldin A on guanine nucleotide-exchange proteins for ADP-ribosylation factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2752-7.
- Béraud-Dufour S, Robineau S, Chardin P, et al. A glutamic finger in the guanine nucleotide exchange factor ARNO displaces Mg<sup>2+</sup> and the beta-phosphate to destabilize GDP on ARF1. *EMBO J* 1998; 17: 3651-9.
- Goldberg J. Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell* 1998; 95: 237-48.
- Mansour SJ, Skaug J, Zhao XH, Giordano J, Scherer SW, Melançon P. p200 ARF-GEPI: a Golgi-localized guanine nucleotide exchange protein whose Sec7 domain is targeted by the drug brefeldin A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7968-73.
- Chardin P, Mc Cormick F. Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive. *Cell* 1999; 97: 153-5.
- Dell'Angelica E.C, Mullins C, Bonifacino JS. AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *J Biol Chem* 1999; 274: 7278-85.

Anne Peyroche  
Catherine L. Jackson

Service de biochimie et génétique moléculaire, Bâtiment 142, CEA/Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France.

## TIRÉS À PART

A. Peyroche.