

## **L**e complexe SNARE au cœur de la fusion membranaire

*Lors du transport vésiculaire intracellulaire, les protéines SNARE constituent des étiquettes qui permettraient la reconnaissance mutuelle et le déclenchement de la fusion entre vésicule et membrane cible. Les SNARE présynaptiques : syntaxine 1, SNAP-25 dans la membrane plasmique, et VAMP 2 (synaptobrevine) dans la vésicule synaptique, jouent un rôle primordial dans l'exocytose*

*dépendante du calcium. Elles sont les substrats des neurotoxines botuliques et tétanique, inhibiteurs puissants de l'exocytose, et possèdent en outre la capacité de former un complexe hétérotrimérique très stable. La structure cristallographique du complexe SNARE suggère que son assemblage rapprocherait les membranes vésiculaire et plasmique, favorisant le mélange des bicouches, et la fusion.*

**D**ans toutes les cellules eucaryotes, le transport de molécules entre différents compartiments sub-cellulaires ainsi que leur sécrétion dans le milieu extracellulaire sont assurés par un service de navettes : les vésicules de transport. Le transport vésiculaire a lieu selon deux modes : (1) un mode constitutif lorsqu'il s'agit d'un transport en flux continu ; (2) un mode soumis à régulation quand le transport est étroitement contrôlé par un second message (par exemple l'exocytose calcium-dépendante). L'adressage spécifique et la fusion des vésicules avec la membrane destinataire appropriée doivent faire appel à un système d'étiquetage moléculaire. Les protéines SNARE, composants ubiquitaires, joueraient un rôle dans cette reconnaissance mutuelle, à des étapes qui précèdent ou accompagnent la fusion vésiculaire. Notre analyse portera principalement sur les protéines SNARE qui contrôlent la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique des terminaisons nerveuses. Il s'agit en effet d'un des mécanismes de transport les plus étudiés à l'heure actuelle et qui constitue sans doute la version la plus rapide de l'exocytose dépendante du calcium [1, 2].

Selon un schéma classique (mais nullement acquis), les vésicules synaptiques, issues d'un compartiment

endosomique dans la terminaison axonale, sont chargées en neurotransmetteur et migrent vers la membrane plasmique (figure 1). Les vésicules s'arriment (*docking*), processus défini morphologiquement par l'apposition des membranes vésiculaire et plasmique, avant de subir une maturation (*priming*). Cette maturation est un concept flou qui correspondrait à l'acquisition de la capacité à fusionner en réponse à une augmentation de la concentration cytoplasmique en calcium. Enfin, lorsqu'un potentiel d'action envahit la terminaison, l'influx calcique au travers des canaux dépendants du voltage déclenche l'apparition d'un pore de fusion reliant le lumen de la vésicule au milieu extracellulaire. L'expansion du pore de fusion et l'incorporation de la membrane vésiculaire dans la membrane plasmique conduisent à la libération du neurotransmetteur dans la fente synaptique. Le délai entre l'influx calcique et l'exocytose est de l'ordre de quelques centaines de microsecondes. Les composants membranaires des vésicules sont ensuite récupérés par une endocytose compensatrice, principalement dépendante de la clathrine. Les mécanismes précis du recyclage sont encore un sujet de débat, et il est possible que plusieurs voies alternatives co-existent (voir ①-③ dans la légende de la figure 1).

Ainsi le cycle complet des vésicules synaptiques, qui dure environ une minute, peut recommencer. Ce recyclage local de la machinerie de l'exocytose permet à la terminaison nerveuse d'assurer une fonction de sécrétion autonome, loin du corps cellulaire. A l'heure actuelle, de nombreuses données mettent en évidence un rôle essentiel des protéines SNARE à une étape entre l'arrimage et l'exocytose. Les protéines SNARE pourraient être directement responsables du rapprochement des deux bicouches lipidiques qui déclenche la fusion.

### **Historique et terminologie**

Le début des années 1990 a été une période extrêmement fructueuse pour les recherches sur le transport vésiculaire. La caractérisation biochimique des protéines présynaptiques, l'identification des cibles des toxines tétanique et botulique, ainsi que l'analyse génétique de levures mutantes portant des défauts de sécrétion, ont convergé vers l'élaboration d'un modèle cohérent.

L'hypothèse SNARE a été formulée par James Rothman *et al.* [3]. Ce laboratoire a élaboré un système acellulaire afin de disséquer les mécanismes moléculaires du transport vésiculaire entre compartiments golgiens. Cette approche a débouché

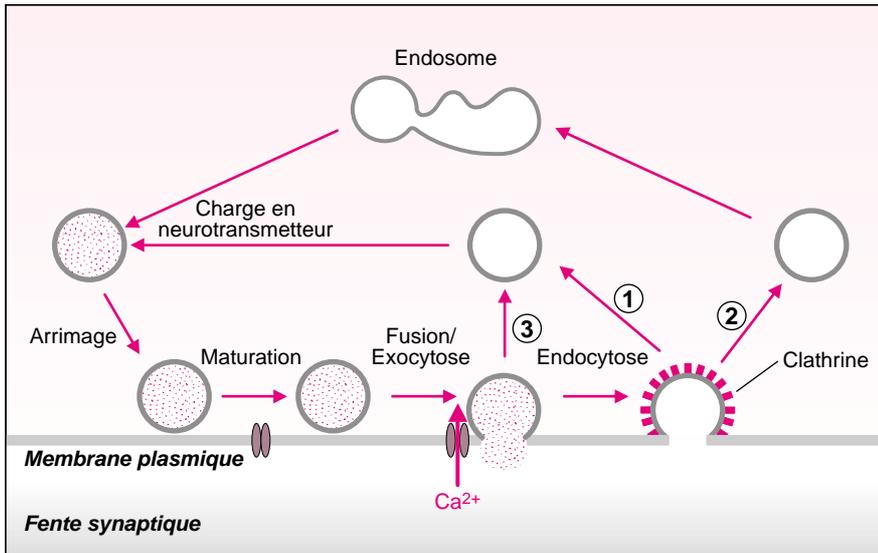


Figure 1. **Cycle des vésicules synaptiques.** Les vésicules synaptiques sont chargées en neurotransmetteur et migrent vers la membrane plasmique. L'arrimage est suivi par la maturation, étape d'acquisition de la capacité à fusionner en réponse à l'influx calcique. Les neurotransmetteurs sont libérés par exocytose, processus étroitement couplé à l'endocytose compensatrice, principalement clathrine-dépendante. Plusieurs voies rendraient compte du recyclage des composants des vésicules. Dans la voie ①, une vésicule d'endocytose recouverte de clathrine (■) se forme à partir de la membrane plasmique, ou d'une invagination de celle-ci. Elle perd ensuite son manteau de clathrine et se recharge en neurotransmetteur [28]. La voie ② classique comprendrait le passage par un compartiment endosomique, incluant donc des étapes supplémentaires de fusion et de bourgeonnement. Alternativement, ces endosomes pourraient correspondre aux vacuoles formées par scission des invaginations de la membrane plasmique [28]. Ces vacuoles maintiendraient la capacité de produire les vésicules synaptiques par bourgeonnement clathrine-dépendant et puis perte du manteau, analogue à la voie ①. Enfin selon l'hypothèse « kiss-and-run », la libération des neurotransmetteurs serait assurée par ouverture transitoire d'un pore de fusion. Après la fermeture de ce pore, la vésicule se détacherait (voie ③), sans être incorporée dans la membrane plasmique et se rechargerait. La co-existence de toutes ces voies de recyclage est envisageable, l'une ou l'autre prédominerait selon les conditions physiologiques.

tout d'abord sur la découverte d'une ATPase cytoplasmique impliquée dans la fusion, la *N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein* (NSF) et sur des protéines adaptatrices permettant la liaison de la NSF aux protéines membranaires : les *soluble NSF adaptor proteins* ( $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$  SNAP) [4, 5]. Ensuite est venue l'identification des protéines membranaires réceptrices des SNAP, qui constitueraient un motif de reconnaissance entre vésicules de transport et membranes cibles : les *SNAP receptors* (SNARE se prononce « mers » et non « mares »). Les premières SNARE, purifiées à partir

d'un lysat de cerveau grâce à leur affinité pour une matrice des protéines NSF/SNAP recombinantes, étaient trois protéines présynaptiques déjà identifiées dans d'autres contextes [3]. Il s'agit d'une protéine de la vésicule synaptique, la *vesicle associated membrane protein 2* (VAMP 2 ou synaptobrevine), et de deux protéines de la membrane plasmique, la syntaxine 1 et la *25 kDa synaptosome-associated protein* (SNAP-25, à ne pas confondre avec les SNAP  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$  mentionnées ci-dessus). Il a alors été proposé que la formation d'un complexe SNARE hétérotrimérique,

entre la VAMP 2 (« vesicular » ou v-SNARE), la syntaxine 1 et la SNAP-25 (« target » ou t-SNARE) permettrait la reconnaissance spécifique entre la vésicule de transport et sa cible. Cet aspect de l'hypothèse SNARE reste toujours d'actualité. Cependant l'idée initiale selon laquelle la NSF, en interagissant avec les SNARE, aurait hydrolysé l'ATP et déclenché la fusion membranaire est actuellement rejetée. La NSF agirait plutôt comme une protéine chaperon qui dissocie le complexe SNARE et/ou modifie la conformation des SNARE individuels [6, 7].

Les premières évidences en faveur de l'importance fonctionnelle des SNARE synaptiques ont été fournies par l'étude du mode d'action des neurotoxines bactériennes produites par *Clostridium tetani* et *Clostridium botulinum*, responsables respectivement du tétanos et du botulisme. Ces toxines clostridiales sont la toxine tétanique (TeNT) et les sérotypes A à G des toxines botuliques (BoNT) qui agissent en bloquant l'exocytose des neurotransmetteurs. Elles sont constituées de deux chaînes polypeptidiques de 100 kDa et 50 kDa reliées par un pont disulfure. La chaîne lourde agit comme vecteur pour introduire la chaîne légère dans le cytoplasme de la terminaison nerveuse. La chaîne légère comporte une activité métalloprotéasique avec une spécificité de substrat très marquée. En effet, l'action inhibitrice de ces toxines sur la fusion des vésicules synaptiques résulte du clivage des protéines SNARE, VAMP 2 (TeNT, BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F, BoNT/G), SNAP-25 (BoNT/A, BoNT/E) ou syntaxine 1 (BoNT/C) [8].

Enfin, des approches génétiques ont été développées, visant à rechercher les défauts moléculaires chez les mutants de levure présentant des anomalies de transport ou de fusion vésiculaire. Grâce à cette approche, de nombreuses protéines possédant des homologies de séquence avec les trois SNARE synaptiques, les SNAP, la NSF et d'autres protéines régulatrices du système SNARE, ont été mises en évidence. La localisation spécifique de différentes SNARE dans un compartiment sub-cellulaire donné (réticulum endoplasmique,

Golgi, lysosome, vacuole, ou membrane plasmique) chez la levure suggère que le système SNARE opère quasiment à tous les niveaux du transport intracellulaire [9]. Une situation analogue existe dans les cellules de mammifère : à l'heure actuelle, la famille des SNARE comporte une vingtaine de syntaxines, une dizaine de VAMP et trois variants de SNAP-25. La libération calcium-dépendante des neurotransmetteurs au niveau des terminaisons nerveuses représenterait donc seulement un variant sophistiqué d'un mécanisme cellulaire fondamental, ubiquitaire et fortement conservé au cours de l'évolution.

### Structure du complexe SNARE

Les études structurales des protéines SNARE, et surtout du complexe SNARE synaptique (figure 2), ont apporté des informations de première importance. Elles suggèrent que ces protéines n'assureraient pas seulement la reconnaissance mutuelle des membranes destinées à fusionner, mais déclencheraient également le mélange des deux bicouches phospholipidiques.

La syntaxine 1 (35 kDa) est une protéine membranaire de type II, localisée essentiellement dans la membrane plasmique. Elle comporte une région N-terminale orientée vers le cytoplasme (résidus 1-120), qui contient trois motifs distincts en hélice  $\alpha$ , impliqués dans la régulation de l'assemblage du complexe SNARE. Le motif qui assure la liaison des deux partenaires (SNAP-25 et VAMP), est contenu dans une région plus centrale (résidus 180-262) également en hélice  $\alpha$ . Enfin le segment transmembranaire est très proche de l'extrémité C-terminale, laissant quelques résidus dans le milieu extracellulaire. La SNAP-25 (25 kDa) ne possède aucune région transmembranaire. Elle est ancrée dans la membrane plasmique par l'intermédiaire de la palmitoylation des résidus cystéine localisés au milieu de la chaîne polypeptidique, et orientée vers le cytoplasme. La SNAP-25 renferme deux motifs d'interaction avec les autres SNARE, séparés par la boucle d'ancrage palmitoylée.

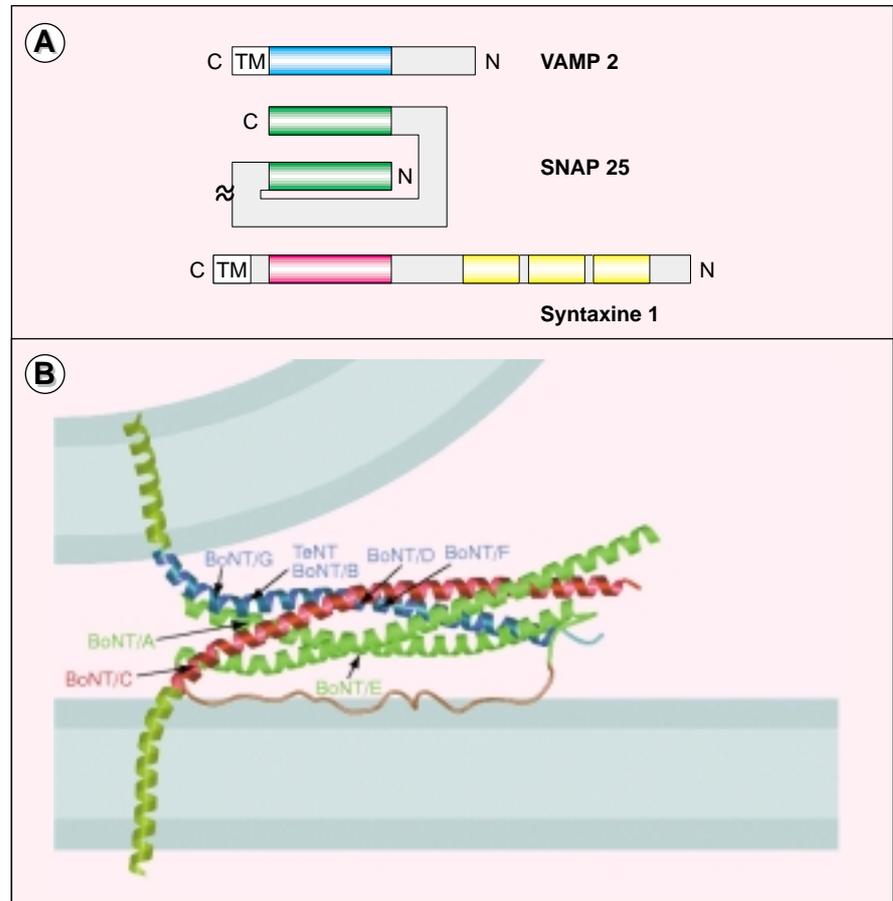


Figure 2. **Structure en domaines et modèle du complexe SNARE minimal. A.** Représentation linéaire des SNARE synaptiques. La formation du complexe SNARE met en jeu des interactions entre les quatre domaines en hélice  $\alpha$  alignés, de la syntaxine (1 rouge), de la SNAP-25 (2 verts), et de la VAMP 2 (1 bleu). Les protéines sont illustrées (d'après [2]) suivant une orientation parallèle identique au modèle du complexe (figure 2B), avec les domaines d'ancrage membranaire : segments trans-membranaires carboxy-terminaux (TM) de syntaxine et de VAMP, ou motifs palmitoylés (-) de SNAP-25 ; à gauche. Le segment amino-terminal de la syntaxine contient 3 domaines supplémentaires en hélice  $\alpha$  (jaune), qui constituent une région de régulation. **B.** Modèle hypothétique du complexe SNARE à l'interface entre la membrane d'une vésicule synaptique et la membrane plasmique. Sutton et al. [11] ont extrapolé la structure du complexe minimal, déterminée par cristallographie, afin d'inclure les domaines d'ancrage membranaire. Noter que la syntaxine est dépourvue de la région régulatrice amino-terminale. La position des différents sites de clivage par les BoNT et la TeNT est indiquée par les flèches. Le complexe est un faisceau superhélicial, composé de quatre hélices  $\alpha$  appartenant à la syntaxine 1A (1 hélice rouge), la VAMP 2 (1 hélice bleue) et la SNAP-25 (2 hélices vertes). L'orientation est parallèle, avec toutes les extrémités C-terminales des hélices proches des domaines transmembranaires de la syntaxine et de la VAMP. Les 2 hélices de la SNAP-25 sont reliées par la boucle palmitoylée (orange trait fin), qui assure l'ancrage dans la membrane plasmique. Reproduit avec l'autorisation de Nature (Sutton et al. 395, 347-53) copyright 1998, Macmillan Magazines Ltd.

La VAMP 2 (13 kDa) est un composant membranaire des vésicules synaptiques et des granules de sécrétion. La partie amino-terminale (résidus 1-33) est variable entre les différentes isoformes, à la différence de la région centrale (résidus 33-96) impliquée dans la formation du complexe SNARE. Le segment transmembranaire est carboxy-terminal.

L'étude des liaisons entre les trois protéines SNARE synaptiques recombinantes a fourni une pléthore de données. Des interactions binaires spécifiques et réversibles, mais d'affinité relativement faible, ont été démontrées entre chaque couple. Cependant, lorsque les trois protéines SNARE synaptiques sont mises ensemble, elles ont la capacité remarquable de former, de manière spontanée et avec une stoechiométrie de 1:1:1, des complexes ternaires d'une stabilité exceptionnelle [10]. Ces complexes SNARE sont résistants à la protéolyse par les toxines clostridiales et ne se dissocient pas à une température inférieure à 70 °C en présence d'un détergent dénaturant. Plusieurs méthodes ont été employées pour disséquer la topologie et la structure tri-dimensionnelle d'un complexe SNARE minimal, notamment la détermination en 1998 de la structure par cristallographie aux rayons-X à une résolution de 2,4 Å [11].

Ce complexe (figure 2B) est un faisceau composé de quatre hélices  $\alpha$ , une provenant de la syntaxine, une de la VAMP, et deux de la SNAP-25, alignées en orientation parallèle (c'est-à-dire avec toutes les extrémités amino-terminales à un bout, et toutes les extrémités carboxy-terminales à l'autre bout du faisceau). Le faisceau est aussi torsadé pour former une structure superhélicale stabilisée par 16 couches d'interaction (numérotées de -7 à +8), principalement hydrophobes. Au centre du faisceau se trouve une interaction ionique critique (désignée couche zéro) entre un résidu arginine (R) de la VAMP et trois glutamines (Q), dont l'une appartient à la syntaxine et les deux autres à la SNAP-25. Ces résidus sont très conservés entre les différentes SNARE homologues et constituent la base d'une nouvelle classification en

R-SNARE et Q-SNARE [12]. Il faut souligner que l'alignement en parallèle des quatre hélices favorise le rapprochement des segments d'ancrage membranaires C-terminaux de la syntaxine 1 et de la VAMP 2 et de ce fait l'apposition des membranes vésiculaire et plasmique.

### Modèle de fusion vésiculaire

Un modèle de fusion des vésicules synaptiques, qui pourrait être étendu à la fusion des membranes intracellulaires en général, a découlé de l'étude des protéines SNARE. Initialement la syntaxine se trouverait dans une conformation fermée avec sa région amino-terminale cytoplasmique repliée contre son domaine central. L'intervention de protéines régulatrices favoriserait l'acquisition d'une conformation ouverte, permissive de la liaison de la SNAP-25 et de la VAMP. L'assemblage du complexe SNARE, débuté dans les régions N-terminales du faisceau et énergétiquement favorable, progresserait spontanément en fermeture éclair vers les régions carboxy-terminales trans-membranaires [13]. Plusieurs complexes SNARE, disposés en cercle à l'interface entre vésicule et plasmalemm, tireraient ainsi la membrane vésiculaire vers la membrane plasmique pour induire un état d'hémifusion (réarrangement des deux bicouches apposées pour former une seule bicouche entre le lumen vésiculaire et le milieu extracellulaire). Un pore de fusion s'ouvrirait dans cette bicouche, et son expansion rapide conduirait à l'incorporation de la membrane de la vésicule dans la membrane plasmique. Lorsque la fusion d'une vésicule synaptique avec la membrane plasmique est complète, le complexe SNARE dont l'assemblage débute en configuration *trans* (protéines SNARE ancrées dans deux bicouches lipidiques différentes) se retrouverait en configuration *cis* (tous les composants ancrés dans le même plan lipidique). Il existe une certaine analogie mécanistique entre l'action des protéines SNARE proposée dans ce modèle, et celle des protéines virales qui assurent la fusion de l'enveloppe virale avec la cellule hôte au cours de

l'infection [14]. Enfin, il faut souligner que beaucoup d'incertitudes subsistent : l'existence même de l'étape d'hémifusion, le mode d'action précis du calcium ainsi que les mécanismes par lesquels le pore de fusion est induit.

### Évaluation fonctionnelle du modèle : certitude et controverses

La seule certitude à l'heure actuelle, fondée sur l'étude de mutants chez la levure, le nématode, la drosophile et la souris ainsi que sur l'inactivation des protéines par les toxines clostridiales, est que les SNARE jouent un rôle primordial dans l'exocytose contrôlée, à une étape proche de la fusion. Toutefois, le rôle exact de la formation du complexe SNARE reste toujours sujet à polémiques.

#### *L'assemblage du complexe SNARE assure-t-il l'arrimage ?*

Il est tentant de conclure que la liaison des SNARE synaptiques rend compte de l'attachement des vésicules synaptiques à la membrane plasmique. Cependant, lorsque les toxines clostridiales pénètrent dans les terminaisons nerveuses, le nombre de vésicules arrimées n'est pas diminué, mais plutôt accru [15]. Il s'agit probablement d'une accumulation de vésicules attachées, qui ne peuvent plus fusionner. Ainsi l'assemblage du complexe SNARE ne serait pas indispensable à l'arrimage mais serait requis pour la fusion.

#### *L'assemblage du complexe SNARE est-il le moteur même de la fusion ?*

Une manière de répondre à cette question est d'évaluer la capacité des protéines SNARE recombinantes, purifiées et réinsérées dans des vésicules artificielles (liposomes), d'induire la fusion *in vitro*. La fusion est évaluée au cours du mélange de deux populations de liposomes (l'une comportant les v-SNARE, l'autre les t-SNARE). Une série de publications récentes, toutes du laboratoire de J. Rothman, semble indiquer que le complexe SNARE constituerait une machinerie minimale de fusion [16-18]. Néanmoins, certaines données jettent un doute sur cette interprétation : d'autres protéines

---

peuvent aussi catalyser la fusion des liposomes dans ce système [19]. De plus, l'analyse *in vitro* de la fusion des vacuoles chez la levure [20] suggère que l'ajout de la NSF, avant la fusion, peut provoquer une dissociation des complexes SNARE en *trans*, et ceci sans compromettre la fusion subséquente.

#### *Les protéines SNARE assurent-elles la spécificité de fusion ?*

Des expériences avec différents variants de syntaxine, VAMP et SNAP-25 ont d'abord montré que quasiment toutes les combinaisons testées forment des complexes stables *in vitro*, malgré leur distribution subcellulaire différentielle [21]. Ces données suggèrent, à première vue, que ce n'est pas la liaison des SNARE en soi qui déterminerait seule la spécificité de fusion. En revanche, des expériences plus fonctionnelles, visant à mesurer la fusion membranaire, soutiennent l'idée que les SNARE confèrent une sélectivité au transport membranaire [18, 22]. En effet, seules les SNARE susceptibles de se retrouver face à face dans une cellule vivante, en configuration *trans* entre deux organites appropriées, semblent être capables de produire la fusion. Les différentes protéines SNARE comporteraient donc des motifs de base nécessaires pour assurer le flux membranaire spécifique entre compartiments intracellulaires. Il faut cependant noter qu'une contribution d'autres facteurs régulateurs, comme notamment les Rab GTPases et les homologues de Sec 1 paraît indiscutable [1, 2].

#### **Et le calcium dans tout ça ?**

Dans les neurones et les cellules neuroendocrines, l'exocytose est déclenchée par un accroissement de la concentration cytoplasmique en calcium, or les protéines SNARE ne présentent aucune sensibilité intrinsèque au calcium. Ainsi il est probable que d'autres protéines partenaires, réceptrices du calcium, confèrent cette propriété essentielle en se liant aux SNARE. Le meilleur candidat pour ce rôle de détecteur calcique à l'heure actuelle est la

synaptotagmine, ou plutôt la famille multigénique des synaptotagmines [23]. La synaptotagmine I est une protéine membranaire des vésicules synaptiques et des granules de sécrétion qui comporte deux domaines C2, capables de lier les phospholipides de manière dépendante du calcium. Par ailleurs, l'interaction de la synaptotagmine I avec la syntaxine 1 est également dépendante du calcium. L'importance primordiale de la synaptotagmine dans la libération dépendante du calcium des neurotransmetteurs a été amplement confirmée par l'étude de mutants de nématode, de drosophile et de souris.

Des résultats récents de notre laboratoire ont également souligné l'importance potentielle d'un récepteur ubiquitaire du calcium, la calmoduline, comme protéine régulatrice du complexe SNARE [24]. Plusieurs études, dans la levure, mais aussi dans les cellules neuroendocrines font apparaître un rôle pour la calmoduline lors de la fusion membranaire. Nous avons mis en évidence un site consensus d'interaction dépendante du calcium de la calmoduline sur la VAMP 2, qui est extrêmement bien conservé au cours de l'évolution. La liaison de la calmoduline inhibe l'assemblage du complexe SNARE *in vitro*, et masque un site d'interaction de la VAMP avec les phospholipides. Ces interactions pourraient être impliquées dans la régulation calcium-dépendante de la fusion membranaire.

#### **Le pore de fusion : lipidique ou protéique ?**

Quelle est la nature du pore de fusion ? S'agit-il d'un pore bordé uniquement par des lipides, créé par l'action mécanique et électrostatique des SNARE, ou existe-t-il une structure de type canal trans-membranaire formée par des protéines ? Les méthodes biophysiques ont mis en évidence des ouvertures et fermetures réversibles du pore de fusion. Cette réversibilité a initialement fourni un argument en faveur du canal protéique (comment un pore lipidique pourrait-il se refermer ?). En fait, des pores transitoires sont

réellement formés dans des systèmes modèles purement lipidiques (pour une discussion voir [2]). Quelle protéine serait susceptible de former un canal de ce type ? Depuis plusieurs années Maurice Israël (Cnrs, Gif-sur-Yvette) *et al.* prêchent dans le désert en faveur du médiatophore [25], une protéine identique à une sous-unité du secteur membranaire (Vo) de la pompe à proton vésiculaire (V-ATPase). Cette hypothèse est soutenue par un article très récent. En effet, Peters *et al.* [26] ont mis en évidence une structure constituée de deux hexamères protéolipidiques associés en *trans*, qui formerait le pore de fusion entre vacuoles de levure : il s'agit également des composants du Vo de la V-ATPase. Il est donc possible que le rôle des SNARE soit de fournir une apposition spécifique et rapprochée de deux membranes, afin de permettre la rencontre de deux secteurs Vo.

#### **SNARE : pathologie et thérapeutique**

Le clivage des protéines SNARE par les neurotoxines clostridiales induit un blocage puissant de la libération des neurotransmetteurs, processus responsable du tétanos et du botulisme. La différence très marquée entre le tétanos (paralysie avec hypercontraction musculaire) et le botulisme (paralysie flasque) provient du fait qu'*in vivo* la toxine tétanique touche principalement les interneurons inhibiteurs dans la moelle épinière, activant donc indirectement les motoneurons, alors que les toxines botuliques réduisent la libération des neurotransmetteurs directement au niveau des terminaisons cholinergiques des motoneurons. La vaccination avec une anatoxine tétanique permet une protection efficace contre le tétanos ; le botulisme est rare dans les pays développés. Néanmoins, l'utilisation potentielle, militaire ou terroriste, des toxines botuliques en tant qu'armes biologiques reste une menace constante. La capacité des toxines botuliques à réduire de manière spectaculaire l'activité des terminaisons cholinergiques en fait également des agents thérapeutiques. L'injection intramusculaire d'une infime quantité de

BoNT/A constitue un des traitements de choix des dystonies et de certaines formes de strabisme, et l'utilisation dans d'autres pathologies (nystagmus, bruxisme, fissures anales avec spasmes de l'ampoule rectale...) est à présent le sujet de nombreuses études.

Certains résultats évoquent aussi un lien entre le complexe SNARE et l'action, toujours très mal comprise, des anesthésiants généraux volatils. On a notamment découvert chez le nématode que certaines mutations dans les protéines SNARE synaptiques induisaient une résistance, ou dans certains cas une hypersensibilité à l'isoflurane et à l'halothane [27]. Enfin, il est probable que les SNARE, en interagissant directement avec certaines protéines membranaires, jouent un rôle dans leur insertion dans la membrane appropriée, et contrôlent aussi leur activité. Dans ce contexte, des interactions de la syntaxine 1 avec les canaux, transporteurs et récepteurs impliqués dans les maladies génétiques, tels que les canaux calcium de type P/Q (migraine familiale hémiplegique, ataxie spinocérébelleuse de type 6), le CFTR (mucoviscidose) et la preséniline (formes familiales de la maladie d'Alzheimer) ont été démontrées.

## Conclusions

Au cours de la dernière décennie, des données issues d'un ensemble d'approches différentes ont convergé pour soutenir l'hypothèse d'un rôle central et ubiquitaire des protéines SNARE dans le transport vésiculaire constitutif et réglé. Les SNARE jouent un rôle à une étape très proche de la fusion entre une vésicule de transport et sa membrane cible mais leur fonction exacte reste encore un sujet de débat intense. Des évidences de plus en plus nombreuses suggèrent que les SNARE contribueraient à la spécificité ainsi qu'à l'induction de la fusion membranaire ■

## RÉFÉRENCES

1. Lin RC, Scheller RH. Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16: 19-49.

2. Jahn R, Südhof TC. Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 863-911.

3. Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, et al. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 1993; 362: 318-24.

4. Block MR, Glick BS, Wilcox CA, et al. Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 7852-6.

5. Whiteheart SW, Griff IC, Brunner M, et al. SNAP family of NSF attachment proteins includes a brain-specific isoform. *Nature* 1993; 362: 353-5.

6. Otto H, Hanson PI, Jahn R. Assembly and disassembly of a ternary complex of synaptobrevin, syntaxin and SNAP-25 in the membrane of synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 6197-201.

7. Xu T, Ashery U, Burgoyne RD, et al. Early requirement for alpha-SNAP and NSF in the secretory cascade in chromaffin cells. *EMBO J* 1999; 18: 3293-304.

8. Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev* 2000; 80: 717-66.

9. Finger FP, Novick P. Spatial regulation of exocytosis: lessons from yeast. *J Cell Biol* 1998; 142: 609-12.

10. Hayashi T, McMahon H, Yamasaki S, et al. Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO J* 1994; 13: 5051-61.

11. Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, et al. Crystal structure of a SNARE complex at 2.4 Angstroms resolution. *Nature* 1998; 395: 347-53.

12. Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT, et al. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNARE. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15781-6.

13. Hanson PI, Heuser JE, Jahn R. Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes. *Curr Opin Neurobiol* 1997; 7: 310-15.

14. Skehel JJ, Wiley DC. Coiled coils in both intracellular fusion and viral membrane fusion. *Cell* 1998; 95: 871-4.

15. Hunt JM, Bommert K, Charlton MP, et al. A post-docking role for synaptobrevin in synaptic vesicle fusion. *Neuron* 1994; 12: 1269-79.

16. Weber T, Zemelman BV, McNew JA, et al. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 1998; 92: 759-72.

17. Nickel W, Weber T, McNew JA, et al. Content mixing and membrane integrity during membrane fusion driven by pairing of isolated v-SNARE and t-SNARE. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12571-6.

18. McNew JA, Parlati F, Fukuda R, et al. Compartmental specificity of cellular mem-

brane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* 2000; 407: 153-9.

19. Mayer A. Intracellular membrane fusion: SNARE only? *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 447-52.

20. Ungermann C, Sato K, Wickner W. Defining the functions of trans-SNARE pairs. *Nature* 1998; 396: 543-8.

21. Fasshauer D, Antonin W, Margittai M, et al. Mixed and non-cognate SNARE complexes. *J Biol Chem* 1999; 274: 15440-6.

22. Scales SJ, Chen YA, Yoo BY, et al. SNARE contribute to the specificity of membrane fusion. *Neuron* 2000; 26: 457-64.

23. Schiavo G, Osborne SL, Sgouros JG. Synaptotagmins: more isoforms than functions? *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248: 1-8.

24. Quetglas S, Leveque C, Miquelis R, et al. Calcium-dependent regulation of synaptic SNARE complex assembly via a calmodulin and phospholipid binding domain of synaptobrevin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 9695-700.

25. Dunant Y, Israel M. Neurotransmitter release at rapid synapses. *Biochimie* 2000; 82: 289-302.

26. Peters C, Bayer MJ, Bühler S, et al. Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature* 2001; 409: 581-8.

27. Van Swinderen B, Saifee O, Shebester L A, et al. A neomorphic syntaxin mutation blocks volatile-anesthetic action in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2479-84.

28. Takei K, Mundigl O, Daniell L, et al. The synaptic vesicle cycle: a single budding step involving clathrin and dynamin. *J Cell Biol* 1996; 133: 1237-50.

**Michael Seagar**  
**Stéphanie Quetglas**  
**Cécile Iborra**  
**Christian Lévêque**

*Inserm U. 464, IFR Jean-Roche, Faculté de médecine secteur Nord, Université de la Méditerranée, boulevard Pierre-Dramard, 13916 Marseille Cedex 20, France.*

TIRÉS À PART

M. Seagar.