

Les nouvelles de ce numéro ont été préparées par :
Cherif Beldjor⁽¹⁾
Pascale Briand
Jean-Claude Dreyfus
Hélène Gilgenkrantz⁽¹⁾
Jean-Pierre Grünfeld
Axel Kahn
Vincent Lotteau⁽²⁾
Claude Matuchansky
Marc Peschanski
Christian de Rouffignac⁽³⁾

(1) Institut Cochin de génétique moléculaire (ICGM), Inserm U. 129, CHU Cochin, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France.
 (2) Inserm C/JF 8804, Institut biomédical des Cordeliers, Immunogénétique, 15, rue de l'École-de-Médecine, 75006 Paris, France.
 (3) CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

SOMMAIRE DES NOUVELLES BRÈVES

La lésion moléculaire de la myotonie de Thomsen (p. 805).
 Les cellules LAK recouvertes d'anticorps inhibent la croissance des cellules cancéreuses *in vivo* (p. 805).
 Une banque géante de jumeaux pour l'étude du vieillissement (p. 806).
 L'interféron α dans le traitement des cryoglobulinémies mixtes (p. 806).
 Inhibition du couplage des récepteurs des catécholamines aux protéines G (p. 810).
 Mutations du récepteur de la *melanocyte-stimulating hormone* (MSH) et couleurs de tout poil (p. 810).
 Diarrhée chronique, lambliaose et anomalie de la réponse anticorps IgA chez des enfants sans hypo- α -globulinémie (p. 811).
 Les fibroblastes périrtubulaires rénaux produisent l'érythropoïétine (p. 811).
 La biopsie de trophoblastes avant la 9^e semaine de grossesse est-elle dangereuse ? (p. 811).
 Des molécules portées par la membrane des oligodendrocytes inhibent la croissance axonale en augmentant le calcium cytosolique (p. 812).
 L'interleukine 13 : une nouvelle cytokine impliquée dans l'inflammation et la réponse immunitaire (p. 812).
 Des mammoths nains au temps des pharaons (p. 812).
 Rôle du CD8 dans l'activation lymphocytaire par *Trypanosoma brucei* (p. 813).
 Mort cellulaire programmée induite par le céramide (p. 813).

Lysozyme et amylose (p. 813).
 Existe-t-il une isoforme rénale des récepteurs V_2 de l'arginine-vasopressine ? (p. 814).
 Myopathie de Fukuyama et glycoprotéines associées à la dystrophine (p. 814).
 Au pays des neurones dormants, l'épilepsie s'éveille (p. 814).
 Chromatine et transcription des gènes de classe III (p. 814).
 Prévention de la mort fœtale par l'interleukine 3 dans le syndrome antiphospholipide expérimental (p. 817).
 Un nouveau membre de la famille du TNF s'associe à la lymphotoxine (p. 817).
 Production d'érythropoïétine par les cellules d'un méningiome avec polyglobulie (p. 817).
 Régulation du transport apical par les protéines G (p. 818).
 Infection des cellules NK par le virus Herpes 6 (p. 818).
 La variation génétique du virus d'Epstein-Barr permet son échappement à la reconnaissance cytotoxique (p. 818).
 La résistance aux hormones corticoïdes est caractérisée par une élévation du cortisol sanguin, avec son cortège d'effets secondaires, mais sans syndrome de type Cushing (p. 819).
 Diabète insulino-dépendant transmis par greffe de moelle osseuse (p. 819).

Des récepteurs membranaires définissent la spécificité du transport des vésicules

Le transport intracellulaire le long des voies d'exocytose et d'endocytose est généralement effectué par des vésicules. Les vésicules de transport bourgeonnent à partir du compartiment donneur et fusionnent avec le compartiment accepteur. Ce mécanisme doit être doublé d'un système de ciblage permettant aux vésicules de reconnaître les bons partenaires de fusion. Par exemple, les vésicules synaptiques doivent spécifiquement fusionner avec la membrane présynaptique pour délivrer les neurotransmetteurs dans la synapse et non avec les membranes de l'appareil de Golgi ou du réticulum endoplasmique. C'est grâce au ciblage sélectif des dif-

férentes vésicules que l'intégrité structurale et fonctionnelle de la cellule peut être maintenue. La spécificité d'arrimage des vésicules pourrait être réglée par des récepteurs membranaires appartenant à des compartiments donneur et accepteur. L'appariement d'un couple différent de récepteurs donneur-accepteur déterminerait la spécificité des arrimages à chaque nouvelle étape du transport. Les derniers résultats de Söllner *et al.* (New York, USA) concernant l'identification de récepteurs membranaires impliqués dans la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique semblent confirmer la validité du modèle proposé [1].

Plusieurs protéines solubles impliquées dans le transport des vésicules à différentes étapes ont été préalablement caractérisées sur des bases fonctionnelles (voir [2] pour revue). C'est en reconstituant *in vitro* l'assemblage de ces protéines en présence d'extraits membranaires de cerveau que des récepteurs participant à l'attachement des vésicules synaptiques à la membrane plasmique ont pu être identifiés. NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive fusion*) est un homotétramère soluble de 76 kDa qui est impliqué dans de nombreux événements de fusion membranaire. NSF possède deux sites de fixation de l'ATP dont l'hydrolyse détermine la stabilité

et l'attachement aux membranes. Cet attachement aux membranes n'est pas direct mais est établi par l'intermédiaire d'autres protéines solubles dénommées SNAP (*soluble NSF attachment proteins*). NSF s'associe aux protéines SNAP lorsqu'elles sont fixées à des récepteurs membranaires (SNARE, pour *SNAP receptors*) (figure 1). Parmi les trois protéines SNAP purifiées, α SNAP et β SNAP sont très semblables, mais γ SNAP présente de grandes différences. α SNAP et β SNAP se fixent de façon compétitive sur le même récepteur membranaire. La fixation non compétitive de γ SNAP sur les mêmes complexes augmente leur affinité pour NSF. L'expression de β SNAP, restreinte au cerveau, suggère que cette protéine a une fonction plus spécialisée que α SNAP et γ SNAP qui sont exprimées dans de nombreux tissus [3]. Les complexes NSF-SNAP-SNARE sédimement comme une particule de 20S qui se dissocie par hydrolyse d'ATP et libère le NSF. La fusion membranaire est donc en partie réglée par le pouvoir d'assemblage et de dissociation des sous-unités de la particule 20S contrôlé par l'ATP. Les auteurs ont utilisé cette caractéristique de la particule 20S pour purifier les récepteurs membranaires SNARE. Les particules 20S sont reconstituées *in vitro* par addition d'extraits membranaires de cerveau bovin à un mélange de protéines recombinantes purifiées NSF, α SNAP et γ SNAP (figure 1). Les complexes SNARE-SNAP-NSF sont ensuite isolés avec des anticorps insolubilisés dirigés contre NSF recombinant. Une première élution non spécifique est faite avec le Mg-ATP γ s suivie d'une élution spécifique avec Mg-ATP. Sous l'effet de l'hydrolyse de l'ATP, les particules 20S se dissocient et libèrent les protéines SNAP et leurs récepteurs SNARE dans l'éluat alors que NSF reste accroché aux anticorps. Après électrophorèse, les protéines spécifiquement éluées par l'hydrolyse de l'ATP sont purifiées puis digérées avec la trypsine. Les peptides sont ensuite séparés par HPLC avant d'être micro-séquencés. Cette méthode autorise la purification des SNARE par des critères fonctionnels mais sélectionne probablement les récepteurs ayant l'affinité

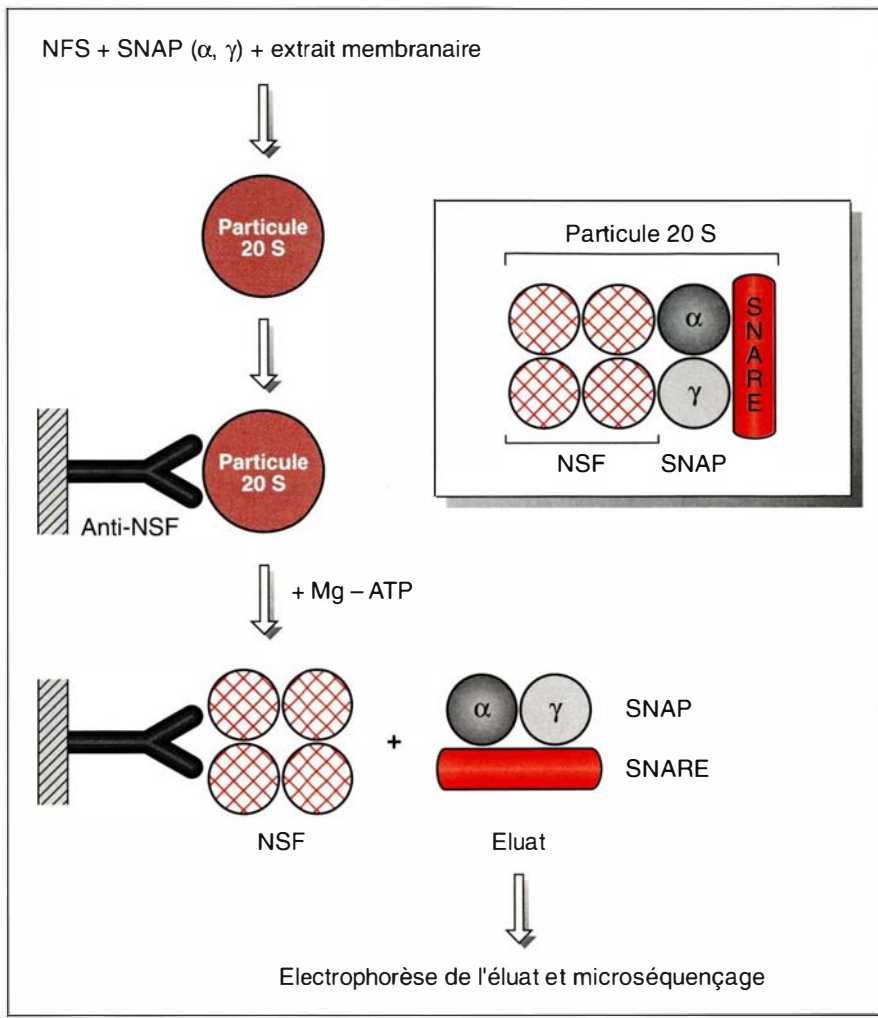


Figure 1. **Identification des récepteurs membranaires (SNARE).** Les particules 20S sont reconstituées par assemblage des protéines recombinantes NSF, α SNAP et γ SNAP en présence d'extraits membranaires et d'ATP non hydrolysable. Les particules 20S sont fixées sur une matrice solide par l'intermédiaire d'anticorps. L'élution des SNAP et SNARE est effectuée par addition de Mg-ATP qui est immédiatement hydrolysé. Les SNARE sont identifiés par microséquénçage après électrophorèse.

maximale et/ou les plus abondants. En plus des protéines SNAP, quatre polypeptides sont ainsi purifiés et identifiés. Il s'agit des syntaxines A et B, de la synaptobrevine-2 (ou VAMP-2 pour *vesicle associated membrane protein*) et d'une protéine malencontreusement appelée SNAP-25 (pour *synaptosome-associated protein 25K*). Ces protéines n'étant pas

connues pour former des hétérodimères, il est possible qu'elles représentent des récepteurs différents. La localisation intracellulaire des syntaxines et de la synaptobrevine suggère un mécanisme simple d'arrimage des vésicules selon lequel le complexe NSF-SNAP ferait le lien entre la synaptobrevine des vésicules synaptiques et la syntaxine de la membrane présynaptique (figure 2, p. 804). L'aspect directionnel et spéci-

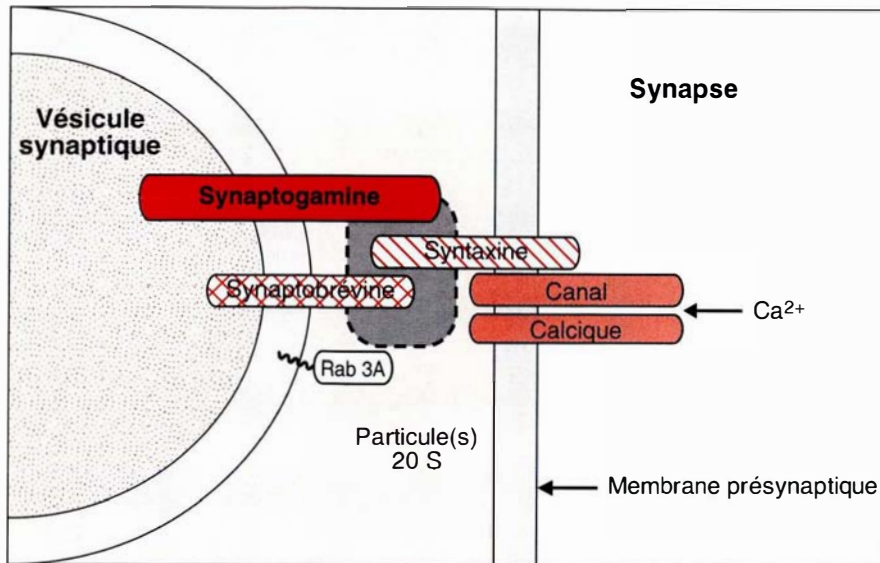


Figure 2. **Modèle de l'arrimage des vésicules synaptiques à la membrane présynaptique.** L'attachement d'une vésicule à la membrane cible est un processus qui nécessite l'interaction de protéines spécifiques de chaque compartiment. Syntaxine et synaptobrevine sont les deux récepteurs identifiés dans cette étude. Ils seraient liés par l'intermédiaire du complexe NSF/SNAP (en gris). Un rôle dans l'arrimage des vésicules, ou la fusion des membranes, a été suggéré pour d'autres protéines dont certaines, comme la synaptogamine et la petite protéine G Rab 3A, sont représentées dans ce schéma. (Voir détail dans le texte.)

fique du transport des vésicules s'expliquerait alors en partie par la présence de deux récepteurs des protéines SNAP, l'un présent à la surface de vésicules de transport, l'autre identifiant la membrane cible. Ainsi, la spécificité de l'arrimage des vésicules aux membranes cibles, déterminée par les deux récepteurs, serait indissociable du système de fusion dépendant du NSF. Le quatrième récepteur identifié, SNAP-25, est une protéine soluble associée aux membranes grâce à la palmitoylation de ses cystéines. Bien que le palmitoyl-CoA soit un facteur nécessaire à la fusion membranaire, le rôle de SNAP-25 reste à définir.

La synaptobrevine est une protéine de 18 kDa accrochée à la face cytoplasmique des vésicules synaptiques par un segment transmembranaire unique. L'inhibition du relargage des neurotransmetteurs par les toxines du botulisme et du téanos, qui sont des protéases de la synaptobrevine, montre le

rôle essentiel de ce récepteur lors de la fusion des vésicules synaptiques *in vivo*. Des homologues de la synaptobrevine, définis par des critères immunologiques, ont été décrits dans les adipocytes sur les vésicules contenant le transporteur du glucose GLUT4. Ces vésicules fusionnent avec la membrane plasmique en réponse à une stimulation par l'insuline. La présence d'homologues de la synaptobrevine dans des cellules autres que des neurones suggère que ces protéines font partie d'une même famille de récepteurs des protéines SNAP.

Les syntaxines (A et B) sont des protéines de 35 kDa accrochées à la membrane présynaptique par une seule région transmembranaire. On les retrouve principalement au niveau des zones d'activité de la membrane où sont arrimées des vésicules synaptiques prêtes à relarguer leur contenu en réponse à une entrée de calcium [4]. La rapidité de ce relargage suggère

que, lorsque les vésicules sont arrimées à la membrane présynaptique, les différentes composantes de la machinerie de fusion sont pré-assemblées mais non fonctionnelles. Il est intéressant de noter à ce propos que la syntaxine peut être directement associée à une autre protéine des vésicules synaptiques, la synaptogamine, dont la conformation est dépendante du calcium [5]. Les conditions expérimentales utilisées dans ce travail ne permettent pas d'observer l'interaction entre syntaxine et synaptogamine. Il est possible que la synaptogamine et la petite protéine G Rab-3A, qui se dissocie des vésicules synaptiques lors de la fusion, participent au contrôle de la fusion des membranes par un mécanisme dépendant du flux de calcium provoqué par le potentiel d'action.

Les protéines NSF, SNAP, syntaxines et synaptobrevine ont des homologues chez la levure qui sont impliqués dans la fusion et le transport des vésicules *in vivo*. Cela indique que le modèle proposé ci-dessus n'est pas spécifique d'un type cellulaire et pourrait être généralisé à l'ensemble des cellules eucaryotes. NSF et SNAP pourraient être les composantes communes aux fusions successives entre vésicules de transport et membrane cible alors que la spécificité des arrimages serait déterminée par les récepteurs des protéines SNAP. Nul doute que d'autres récepteurs des protéines SNAP seront bientôt identifiés et localisés *in situ*.

V. L.

1. Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 1993 ; 362 : 318-24.
2. Rothman JE, Orci L. Molecular dissection of the secretory pathway. *Nature* 1992 ; 355 : 409-15.
3. Whiteheart SW, Griff IC, Brunner M, O'Clary D, Mayer T, Buhrow SA, Rothman JE. Snap family of NSF attachment proteins includes a brain-specific isoform. *Nature* 1993 ; 362 : 353-5.
4. Bennett MK, Calakos N, Scheller RH. Syntaxin : a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* 1992 ; 257 : 255-9.
5. Brose N, Petrenko AG, Südhof TC, Jahn R. Synaptogamin : a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* 1992 ; 256 : 1021-5.