

BIOLOGIE CELLULAIRE

L'ACTIVITE BIOSYNTHETIQUE DANS LE RETICULUM ENDOPLASMIQUE

INTRODUCTION

LES CARACTERES DISTINCTIFS DES CELLULES EUCARYOTES ET PROCARYOTES

Les cellules eucaryotes sont compartimentées : elles sont entourées d'une membrane plasmique. D'autres membranes intracellulaires délimitent des compartiments au sein de la cellule, chaque compartiment étant caractérisé par une structure, une composition chimique et des fonctions bien précises. L'**enveloppe nucléaire** délimite deux compartiments majeurs, le nucléoplasme et le cytoplasme. Les **chromosomes** qui contiennent les gènes de la cellule et l'outillage nécessaire à l'expression des **gènes** se trouvent dans le noyau, tandis que chez les procaryotes, ces éléments sont dans le cytoplasme. La plupart des cellules eucaryotes ont un **réticulum endoplasmique** (site de synthèse des protéines et des phospholipides), un **appareil de Golgi** (un organite qui ajoute des sucres aux protéines membranaires, aux protéines lysosomiales et aux protéines sécrétées), des **lysosomes** (un compartiment contenant des enzymes de digestion), des **peroxysomes** (compartiments contenant des enzymes impliquées dans des réactions oxydatives) et des **mitochondries** (structures qui convertissent en ATP l'énergie contenue dans les liaisons chimiques des nutriments).

Les cellules eucaryotes ont un cytosquelette : trois polymères protéiques - **filaments d'actine**, **microtubules** et **filaments intermédiaires** - forment une matrice cytoplasmique visqueuse et élastique qui fournit à la cellule une mécanique. En outre, les filaments d'actine et les microtubules servent de guide pour plusieurs protéines qui permettent la mobilité de la cellule entière et celle des organites à l'intérieur du cytoplasme. Le **cytosquelette** de filaments d'actine et de microtubules est indispensable à la survie, même chez les champignons et les plantes possédant une paroi cellulaire rigide qui constitue leur charpente mécanique et empêche les mouvements de la cellule entière.

LES COMPARTIMENTS MEMBRANAIRES DANS DIFFERENTES CELLULES

Chez les organismes pluricellulaires, le nombre et la taille des compartiments cellulaires varient d'un type cellulaire à l'autre, car chacun est orienté vers des fonctions distinctes et spécialisée. Un organite a souvent le monopole d'une fonction donnée ; par exemple, le réticulum endoplasmique (RE) synthétise des protéines et des lipides membranaires, les lysosomes dégradent les protéines et les mitochondries fournissent de l'énergie. Cette division du travail présente de nombreux avantages, mais soulève également de nombreux problèmes de coordination des activités cellulaires, de biosynthèse des organites et de division cellulaire.

LA COMPARTIMENTATION PRESENTE DE NOMBREUX AVANTAGES

Un organite est délimité par une **membrane semi-perméable** qui établit un **microenvironnement** dans lequel enzymes, cofacteurs et substrats sont **concentrés**, ce qui accélère la vitesse des interactions moléculaires. De plus, l'environnement moléculaire de part et d'autre de la membrane semi-perméable peut être modulé pour obtenir un **milieu ionique adéquat** (pH, concentration de cations bivalents, potentiel redox) ou une **asymétrie ionique** (pH, gradient ionique et/ou électrique) nécessaire pour une **activité donnée**. Ce microenvironnement résulte en partie de l'**activité spécifique** des pompes, des transporteurs et des canaux des organites. Les

enzymes transmembranaires des organites sont plus efficaces parce que la **diffusion** des substrats et des produits est **délimitée** à deux dimensions. En ce qui concerne les **molécules hydrophobes**, l'inclusion dans un compartiment membranaire présente un avantage évident puisque ces molécules **restent à l'abri de l'eau**. La compartimentation permet également de **séquestrer des activités à risque** telles que celles des enzymes de dégradation des lysosomes, des enzymes oxydatives des peroxysomes et les activités létales de l'espace intermembranaire des mitochondries.

LES PROBLEMES LIES A LA COMPARTIMENTATION

Dans la mesure où les compartiments ne sont pas autonomes, leurs activités doivent être intégrées pour bénéficier à l'ensemble de la cellule. Des mécanismes de transport sont donc nécessaires entre les compartiments et à travers les membranes qui les délimitent. On distingue des compartiments cellulaires impliqués dans la **biosynthèse**, l'**exocytose** et l'**endocytose** qui sont reliés par des séries fonctionnelles, appelées **voies**, qui permettent le **transport vectoriel** des molécules d'un compartiment à l'autre. Les transports membranaires à travers ces deux voies doivent être régulés et équilibrés pour établir et préserver la taille des compartiments et pour assurer le doublement du contenu des membranes cellulaires avant la division.

RIBOSOMES, SYNTHÈSE PROTÉIQUE, COMPARTIMENTS ET TRAFFIC

LES DIFFÉRENTS MODES DE TRANSPORT

Les protéines se déplacent entre les compartiments de différentes façons :

- Le transport **par porte** : c'est le transport bidirectionnel continu des molécules entre le noyau et le cytosol ;
- Le transport **transmembranaire** : c'est le transport des protéines dans les mitochondries et les chloroplastes ;
- La translocation **co-translationnelle** des protéines vers le réticulum endoplasmique ;
- Le transport **vésiculaire** du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi.

LA PRISE DE DÉCISION POUR CHAQUE PROTÉINE POUR CHAQUE VOIE DE TRANSPORT

Schéma

LA MEMBRANE CROÎT PAR L'EXPANSION DE LA MEMBRANE PRÉEXISTANTE

Les lipides sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique lisse et ont besoin de transporteurs pour les amener vers les différents organites. Ils sont utilisés par le métabolisme lipidique générant des dérivés lipidiques.

LES INTERACTIONS AVEC LE RECEPTEUR SIGNAL CIBLE LES CONSTITUANTS CELLULAIRES VERS LEUR BONNE LOCALISATION

Cf. TIG

LES PROTEINES TRANSMEMBRANAIRES

La chaîne polypeptidique traverse la bicouche lipidique sous la forme d'une hélice droite α alors que la chaîne oligosaccharidique et les ponts disulfures se trouvent tous à l'extérieur de la cellule. Les ponts disulfures ne peuvent pas se former entre les groupements -SH dans le domaine cytoplasmique de la protéine parce que l'environnement du cytosol est réducteur et maintient ces groupements sous leur forme réduite.

LE SEGMENT TRANSMEMBRANAIRE

Le segment transmembranaire est une hélice α hydrophobe qui interagit avec les chaînes hydrocarbonées des lipides.

ASSOCIATION DE LA CHAÎNE POLYPEPTIDIQUE AVEC LA BICOUCHE LIPIDIQUE

Les interactions sont régulées et permettent à la cellule d'assembler, sous le contrôle local des mécanismes, les machines moléculaires effectuant des tâches spécifiques.

LES INTERACTIONS COVALENTES ENTRE LA CHAÎNE POLYPEPTIDIQUE ET LA BICOUCHE

Certaines protéines membranaires peuvent être reliées de façon covalente à un lipide de la bicouche lipidique comme par exemple une chaîne d'acide gras ou un groupe $-CH_2$ présent dans la couche supérieure de la bicouche lipidique.

L'ACTIVITE BIOSYNTHETIQUE DANS LE RE ET L'APPAREIL DE GOLGI

LE RETICULUM ENDOPLASMIQUE : STRUCTURE ET DISTRIBUTION CELLULAIRE

Le RE est un système de canaux membranaires présent dans le cytoplasme de toutes les cellules eucaryotes. Les constituants individuels du RE sont des tubules et des saccules appelés **citernes** ; ces éléments sont agencés en un réseau tridimensionnel (un réticulum) qui s'étend de l'enveloppe nucléaire jusqu'à la surface cellulaire. Les microtubules et leurs moteurs génèrent l'extension de ce réseau par traction des membranes du RE vers la périphérie cellulaire avant leur ancrage.

LE RETICULUM ENDOPLASMIQUE : ULTRASTRUCTURE

Le RE se compose de trois régions spécialisées. Le versant cytoplasmique de la membrane du **RE rugueux** est occupé par de nombreux ribosomes qui définissent une région spécialisée dans la synthèse et le repliement des protéines. D'autres territoires, appelés éléments de transition, contiennent des sites de bourgeonnement des vésicules pour exporter des chargements vers l'appareil de Golgi. Le **RE lisse** est constitué d'éléments tubulaires qui ne portent pas de ribosomes ; cette région contient les voies enzymatiques dédiées au métabolisme des médicaments ou le stockage du calcium.

Les dimensions du RE dépendent de la spécialisation fonctionnelle de la cellule. Les cellules spécialisées dans la synthèse, le stockage et la sécrétion régulée des protéines sont riches en RE rugueux. De même, le RE lisse est abondant dans les cellules endocrines qui synthétisent les hormones stéroïdes, et dans les cellules musculaires qui doivent stocker et libérer les ions Ca^{2+} pour réguler la contraction.

TRANSLOCATION DANS LE RETICULUM ENDOPLASMIQUE

La translocation ou l'insertion dans la bicouche de la membrane du RE est nécessaire dans le cas de nombreux lipides, protéines et oligosaccharides synthétisés sur le versant cytoplasmique de la membrane. Toutes ces réactions sont facilitées par les protéines transmembranaires. Les protéines « **basculent** » les phospholipides du versant cytoplasmique vers le versant luminal (interne) de la bicouche lipidique. Les **canaux** avec un revêtement protéique permettent aux chaînes polypeptidiques en croissance de s'insérer ou de traverser la bicouche membranaire. Les protéines facilitent le passage **à travers** la bicouche des oligosaccharides hydrophiles rattachés à de volumineux transporteurs lipidiques.

L'**orientation d'une protéine** dans la bicouche ou **sa distribution vers la lumière** est définie **au cours du passage vers le RE** et elle est **préservée tout au long du transit** dans la voie d'exocytose. Ainsi, les domaines de protéines transmembranaires qui doivent être exposés à la surface cellulaire seront insérés dans le versant luminal de la membrane du RE. De même, les protéines sécrétées solubles doivent être transloquées vers la lumière du RE. Il est intéressant de souligner que ce mécanisme de translocation peut fonctionner dans le sens contraire : les protéines défectueuses sont expulsées du RE vers le cytoplasme pour être dégradées par le protéasome.

LE COUPLAGE DE LA SYNTHÈSE ET DE LA TRANSLOCATION DANS LE RE : L'HYPOTHÈSE DU SIGNAL

Des études précoces ont constaté que les protéines sont **transloquées si rapidement** dans la lumière du RE que la translocation pourrait se produire pendant la synthèse protéique. Des études biochimiques ont montré que les protéines destinées au RE sont synthétisées sous forme de **précurseurs** comportant des acides aminés

supplémentaires en N-terminal qui sont éliminés ultérieurement. Ces observations ont amené à formuler un modèle appelé **hypothèse du signal** :

- Une extension N-terminale appelée **séquence signal** dirige la protéine vers le RE ;
- Un **canal aqueux de la membrane du RE** s'ouvre pour permettre la translocation de la protéine à travers la bicouche hydrophobe ;
- La séquence signal est **éliminée** après translocation dans la lumière.

Les séquences signal qui orientent les protéines vers le RE sont variables, mais comprennent généralement 15 à 25 acides aminés. À leur extrémité N-terminale, elles comportent cinq résidus avec un ou deux acides aminés basiques, suivis de dix à 15 acides aminés hydrophobes non chargés. En l'absence de repliement, la longueur des séquences serait de 8 nm, c'est-à-dire supérieure à l'épaisseur de la bicouche lipidique.

Ces séquences sont nécessaires et suffisantes pour le ciblage des protéines vers le RE, mais ne permettent pas l'orientation vers d'autres organites tels que les mitochondries ou les peroxysomes, qui exigent des signaux spécifiques. L'addition d'une séquence signal du RE en N-terminal permet de diriger la plupart des protéines testées vers le RE.

L'HYPOTHESE D'UN SIGNAL

Lorsque le peptide signal se dégage du ribosome, il le dirige vers un récepteur protéique sur la membrane de RE. Pendant qu'il est synthétisé, le polypeptide est transloqué à travers la membrane du RE par un pore protéique associé au récepteur membranaire. Le peptide signal est éliminé pendant la translation par une signal peptidase et la protéine mature est libérée dans le lumen du RE immédiatement après sa synthèse.

ADRESSAGE DES PROTEINES SECRETEES VERS LE RETICULUM ENDOPLASMIQUE

Les protéines sécrétées entrent dans la lumière du RE à travers un complexe Sec61p. Le polypeptide à transloquer est ancré à la membrane par sa séquence signal qui est ensuite clivée par une signal peptidase. Après ce clivage, la traduction continue à faire progresser l'extrémité N-terminale du polypeptide en cours d'élongation vers la lumière du RE. Le devenir du peptide signal clivé n'est pas connu, aucun n'a jamais été retrouvé, ce qui indique que la dégradation des signaux doit être très efficace.

LA PARTICULE DE RECONNAISSANCE DES SIGNAUX : SRP

Chez les eucaryotes, la SRP est constituée de 6 polypeptides et d'une molécule d'ARN de 300 nucléotides. La structure de l'homologue bactérien est plus simple, car il ne comporte qu'une seule sous-unité. La séquence signal hydrophobe se lie à un sillon riche en méthionines exposées, situé sous la sous-unité protéique SRP54. Comme les poils d'une brosse, les chaînes latérales flexibles de méthionine s'adaptent aux conformations variables des chaînes latérales des acides aminés hydrophobes des différentes séquences de signalisation. Les acides aminés chargés positivement à l'extrémité N-terminale de la séquence signal entrent en interaction avec les phosphates du squelette de la SRP-ARN. La fixation de la séquence signal favorise la liaison du GTP à un autre domaine de la SRP54.

LA SRP54 SE LIE A LA SEQUENCE SIGNAL ET AU RECEPTEUR DE LA SRP

Le complexe SRP-ribosome se fixe au RE sur le récepteur de la SRP qui est un dimère constitué de 2 sous-unités différentes retrouvées uniquement au niveau du RE rugueux des cellules de mammifères. La sous-unité α du récepteur de la SRP reconnaît la SRP54 et transfère le ribosome au complexe de translocation.

LA REGULATION DE LA TRANSLOCATION COTRADUCTIONNELLE DANS LE RE

Le ciblage d'un ribosome qui synthétise une protéine comportant une séquence signal vers la membrane du RE nécessite l'intervention d'un complexe protéine-ARN du cytosol appelé **particule de reconnaissance des signaux SRP**. Lorsqu'une séquence signal sort du ribosome, la SRP se lie à la fois à la séquence signal et au ribosome. Cette interaction entre la SRP et le ribosome suspend l'élongation du polypeptide jusqu'à ce que le ribosome soit mis en place devant le pore de translocation de la membrane du RE. Le complexe SRP peut interférer directement avec la liaison du facteur d'élongation ou de l'ARNt au ribosome. La SRP dirige également le ribosome en arrêt vers un récepteur de la membrane du RE qui, à son tour, transfère le ribosome vers un canal appelé le **complexe de translocation** pour le transloquer à travers la membrane. La dissociation de la **SRP** du ribosome permet la reprise de la synthèse protéique et le passage du polypeptide en croissance vers la lumière du RE à travers un canal aqueux du pore de translocation.

LE TRANSLOCON

Les protéines traversent la membrane du RE par un **canal protéique** étroitement ajusté appelé **complexe de translocation**. Des études biochimiques et génétiques ont permis d'identifier les constituants protéiques de ce pore de translocation qui sont constitués de trois ou quatre copies du complexe Sec61p.

Le pore interagit fortement avec le ribosome et la paroi du pore adhère étroitement au polypeptide en cours de translocation pour empêcher le passage de petites molécules vers la lumière du RE. La séquence signal forme une boucle au sein du canal en exposant l'extrémité N-terminale dans le cytoplasme.

ADRESSAGE D'UNE PROTEINE SOLUBLE SECRETEE DANS LE RE

La séquence signal va interagir fortement avec les protéines, alors que la chaîne polypeptidique va poursuivre sa translocation. Dans le lumen du RE, une peptidase va interagir avec la séquence consensus du signal et la cliver. Pour obtenir une protéine mature, il y aura des repliements peptidiques.

ADRESSAGE D'UNE PROTEINE TRANSMEMBRANAIRE DU RE

Dans le cas le plus simple, l'extrémité C-terminale de la protéine transmembranaire se situe dans le cytoplasme à la fin de la synthèse. Les premières étapes d'acheminement de la protéine vers le RE par un peptide signal sont les mêmes que pour une protéine sécrétée. Cependant, l'insertion de la séquence transmembranaire hydrophobe fonctionne comme un signal d'arrêt du transfert. A la différence des séquences signal, les signaux d'arrêt du transfert ne sont pas clivés. Ces séquences transmembranaires se déplacent latéralement hors du canal de translocation vers la bicouche lipidique et ancrent le polypeptide dans la membrane. A la fin de la traduction, la protéine se présente avec son extrémité N-terminale dans la lumière du RE et son extrémité C-terminale dans le compartiment cytoplasmique.

En l'absence de clivage de la séquence signal, les protéines transmembranaires sont orientées dans la direction opposée. La séquence signal induit le transfert de la protéine, comme il n'y a pas de séquence d'arrêt du transfert c'est une protéine transmembranaire complète qui est libérée.

Une protéine qui possède deux segments transmembranaire est tout d'abord transloquée dans la membrane du RE par un peptide signal présent près de son extrémité N-terminale et possède un signal d'arrêt du transfert. Comme le peptide signal n'est pas clivé à la fin du transfert, la protéine transmembranaire présente ses deux extrémités dans le compartiment cytoplasmique.

ADRESSAGE D'UNE PROTEINE A PLUSIEURS SEGMENTS TRANSMEMBRANAIRES

C'est le cas d'une protéine qui possède plusieurs peptides d'initiation et d'arrêt du transfert. Le premier peptide signal induit le passage du polypeptide en croissance dans la lumière du RE à travers le canal du pore de translocation. La translocation s'arrête lorsque la séquence d'arrêt du transfert interagit avec le canal. Les deux séquences sont donc insérées dans la bicouche et migrent latéralement hors du canal. Il y a répétition du mécanisme jusqu'à ce que tous les peptides d'initiation et d'arrêt du transfert soient insérés dans la bicouche.

REPLIEMENT PROTEIQUE ET OLIGOMERISATION DANS LE RE

Au total, le tunnel au sein de la grande sous-unité ribosomique et le canal du complexe de translocation dans la bicouche membranaire du RE contiennent **70 acides aminés** du polypeptide. Les chaînes polypeptidiques plus longues émergent dans la lumière du RE où elles entrent en contact avec de nombreuses protéines. Elles éliminent la séquence signal, ajoutent des oligosaccharides et régulent le repliement, la formation de ponts disulfures et la constitution d'oligomères. Ces réactions commencent **dès l'entrée de la chaîne dans la lumière** de sorte que les facteurs de modification doivent être situés à proximité du versant luminal du complexe de translocation.

L'activité conjointe de ces protéines assure un contrôle de qualité pour que seules les protéines fonctionnelles soient exportées.

LA N-GLYCOSYLATION

L'**oligosaccharide central** constitué de mannose et de N-acétylglucosamine **est synthétisé dans le cytoplasme** et rattaché au dolichol dans la membrane du RE par des liaisons pyrophosphates riches en énergie. Après le **transfert à travers la bicouche du RE**, la structure de cet élément central est complétée par l'addition de glucides importés dans le RE. L'oligosaccharide achevé est transféré par le **complexe oligosaccharyltransférase** vers la **séquence consensus Asn-X-Ser/Thr** du polypeptide naissant lors de son **émergence dans la lumière du RE**.

LA SYNTHÈSE DU PRECURSEUR DE L'OLIGOSACCHARIDE CENTRAL

L'**oligosaccharide central** est **synthétisé dans le cytoplasme**. La liaison pyrophosphate haute en énergie entre l'oligosaccharide et le dolichol-phosphate dans la membrane du RE est établie en premier. Après le **transfert à travers la bicouche du RE**, la structure de cet élément central est complétée par l'addition de glucides importés dans le RE. Ces glucides sont aussi transférés à travers la bicouche du RE de la même façon que les précurseurs.

PLACE DE L'APPAREIL DE GOLGI DANS LA BIOSYNTHESE : STRUCTURE ET COMPOSITION

L'appareil de Golgi est constitué d'un ensemble d'au moins trois compartiments ou citernes empilés les uns sur les autres. Cet empilement membranaire occupe généralement la région périnucléaire et est entouré par de nombreux tubules et vésicules membranaires. Selon le type cellulaire, l'appareil de Golgi peut se présenter comme un simple empilement contenu autour du noyau ou, dans le cas des cellules épithéliales polarisées, un empilement compact regroupé sur un côté du noyau. Les connexions entre chacune des citernes au sein d'un empilement sont rares, mais les différentes piles sont reliées entre elles par des tubules qui semblent relier les compartiments correspondants d'une pile à l'autre.

Les empilements de Golgi des citernes individuelles sont plus fortement polarisés en fonction de la composition de chaque citerne au sein de chaque empilement de l'appareil de Golgi. Les cargaisons venant du RE pénètrent

généralement par le versant cis du Golgi adjacent au noyau. Ces citernes constituent un réticulum ramifié appelé le réseau cis-Golgien. Les molécules modifiées émergent au niveau des citernes du versant trans à distance du noyau qui constituent un autre réseau tubulaire appelé le réseau trans-Golgien. Le contenu de chaque citerne du Golgi se caractérise par une panoplie différente d'enzymes.

REGION SPECIFIQUE DU GOLGI

Les premières étapes de la synthèse des glycoprotéines se fait dans le RE mais la suite de leur formation est réalisée au cours de leur passage dans le Golgi.

CYCLE DE LA CALNEXINE AU COURS DU REPLIEMENT DES PROTEINES DANS RE

Les glucosidases I et II éliminent rapidement deux ou trois molécules de glucose de la glycoprotéine nouvellement synthétisée et non repliée. Le complexe calnexine-thioloxydoréductase se lie à la protéine monoglucosylée. La glucosidase II élimine le glucose résiduel et libère la protéine. Si la protéine libérée est repliée elle peut sortir du RE. Dans le cas contraire elle est reconnue par une glucosyltransférase et fait l'objet d'une seconde glycosylation pour recommencer le cycle de repliement jusqu'à son achèvement ou entrer dans la voie de dégradation. Les thioloxydoréductases catalysent le réarrangement des ponts disulfures au cours du repliement.

LA DEGRADATION DES PROTEINES MAL REPLIEES DANS LE LUMEN DU RE

La mannosidase I identifie les glycoprotéines présentant un dépliement réfractaire qui doivent être dégradées en synthétisant un oligosaccharide à 8 mannoses qui sont reglucosylé. Ce substrat défavorable pour la glucosidase II reste lié à la calnexine et sera transloqué hors du RE pour être dégradé dans le protéasome.

LES ANCRES GPI

Certaines protéines de type I échangent leur segment transmembranaire C-terminal contre un oligosaccharide ancré à une molécule lipidique, le phosphatidylinositol. Les protéines liées au glycosylphosphatidylinositol (GPI) sont transférées vers ce glycolipide au cours de la traduction : la protéine est clivée sur le versant luminal d'un signal d'arrêt du transfert et elle est ajoutée à un précurseur glycolipidique préformé.

BIOLOGIE CELLULAIRE

TRANSPORT VESICULAIRE DANS LE RE ET L'APPAREIL DE GOLGI

INTRODUCTION

Les protéines et les lipides synthétisés dans le RE déterminent l'élaboration et l'activité fonctionnelle de tous les compartiments des voies d'exocytose et d'endocytose. Les chargements migrent du RE : ils sont véhiculés par des conteneurs lipidiques sous forme de petites vésicules ou de tubules membranaires. La complexité de la circulation intracellulaire est évidente, car elle implique la migration simultanée, efficace et précise de milliers de protéines distinctes entre différents compartiments. En outre, le transport intracellulaire doit s'adapter aux fluctuations constantes des besoins cellulaires et tissulaires en réponse à l'environnement et à la physiologie des organismes.

Le **transport vésiculaire** comporte trois étapes :

- *La sélection du chargement* : des protéines adaptatrices appariant les signaux d'adressage avec des molécules spécifiques de la machinerie de transport.
- *La formation du conteneur* : les protéines constituent des réseaux de revêtement qui favorisent l'étranglement d'une partie du compartiment donneur pour constituer le conteneur de transport. Une large variété de revêtements facilite la formation de vésicules à partir de compartiments d'exocytose et d'endocytose différents.
- *Le ciblage et la fusion du conteneur avec le compartiment suivant* : les protéines membranaires d'ancrage et de fusion orientent le conteneur de transport vers le compartiment cible approprié.

LES CARACTERISTIQUES GENERALES DU TRANSPORT VESICULAIRE

La sélection du chargement, le bourgeonnement vésiculaire et la fusion de la vésicule avec le compartiment receveur se déroulent **sans perdre le contenu** entre le compartiment donneur et le compartiment receveur. **L'intégrité de la membrane est préservée** tout au long des étapes du transport. En outre, l'orientation (appelée **topologie**) des lipides et des protéines dans les bicouches membranaires, définie au cours de la synthèse dans le RE, est **préservée** pendant leur transport dans les vésicules. Ainsi, un versant de la membrane est toujours dirigé vers le cytoplasme tandis que le versant luminal du RE reste à l'intérieur de chaque compartiment vésiculaire et, dans le cas des constituants de la surface cellulaire, ce versant est finalement exposé à la surface externe de la cellule.

L'IMPORTANCE DE LA SELECTION

Chaque vésicule qui bourgeonne au niveau d'un compartiment membranaire donné contient **uniquement** des protéines qui doivent être transportées et ne comporte aucune protéine résidente de ce compartiment. Ainsi la machinerie moléculaire qui donne naissance aux vésicules doit reconnaître des **signaux de recrutements**, qui sont généralement de courtes séquences peptidiques au niveau des protéines cargo. La nécessité d'un contrôle précis de la composition des organites intracellulaires et de la membrane plasmique rend peu vraisemblable la participation significative des mécanismes non sélectifs dans le transport vésiculaire.

Des **motifs de tri** qui orientent le trafic des protéines dans la voie d'endocytose sont bien connus alors que l'identification des motifs responsables de la sortie du RE ne fait que commencer. L'étude du transport de la glycoprotéine vésiculaire du virus de la stomatite (**VSV-G**) a permis de mettre en évidence un type de motif

d'exportation. VSV-G s'organise en un revêtement externe de l'enveloppe membranaire virale. Il s'agit d'une **protéine transmembranaire de type I** avec un grand domaine situé initialement dans la lumière du RE et ultérieurement à la surface du virus. La VSV-G comporte une **courte queue cytoplasmique** avec une **molécule tyrosine (Y) clé** et un motif diacide acide aspartique-x-acide glutamique (**DXE**) dans laquelle x peut être un acide aminé quelconque. La **mutation** de l'acide aspartique ou glutamique en alanine **inhibe l'exportation**. En outre, le transfert de ce motif vers une protéine normalement séquestrée dans le RE entraîne une exportation efficace, ce qui montre que **cet élément permet de diriger la cargaison vers la machinerie d'exportation**. Les motifs diacides-tyrosine sont présents dans les queues cytoplasmiques de nombreuses protéines transmembranaires de type I, y compris celles qui participent à la **signalisation** et à la **captation du cholestérol à la surface cellulaire**. Ainsi, il apparaît que les motifs diacides constituent un code de triage pour une classe de protéines.

Néanmoins, de nombreuses autres protéines ne comportent pas de motif diacide, donc d'**autres signaux** sont nécessairement impliqués dans les mécanismes d'exportation. Un deuxième groupe de signaux pourrait être constitué par l'accumulation de résidus hydrophobes volumineux dans la queue cytoplasmique des protéines cargo.

L'ASSEMBLAGE DU REVÊTEMENT VÉSICULAIRE COPII ET LE BOURGEONNEMENT À PARTIR DU RE

Le conditionnement des cargos dans les conteneurs de transport fait intervenir le **complexe de revêtement II (COPII : coat complex II)**. L'assemblage du revêtement vésiculaire est régulé par la petite GTPase **Sar1**. Comme les autres GTPases, Sar1 alterne entre une forme inactive liée au GDP et une forme activée liée au GTP. Sar1-GDP se trouve dans le compartiment cytoplasmique tandis que Sar1-GTP est liée aux membranes.

ACTIVATION DE SAR1

L'assemblage du revêtement COPII commence par l'activation de Sar1 par Sec12, un **facteur d'échange de nucléotide guanidinique** (GEF : guanine nucleotide exchange factor) lié à la membrane du RE qui facilite l'échange GDP/GTP. Un motif hydrophobe N-terminal de Sar1 permet la reconnaissance de Sec12. Cette étape est régulée par une kinase qui n'est pas connue. Sar1-GTP activée coordonne alors le recrutement des molécules cargos (à partir des motifs de tri) et d'un complexe protéique du cytosol appelé Sec23/24. Le recrutement de Sec23/24 stabilise l'association de Sar1 activée, de la cargaison et d'autres constituants membranaires, en un complexe de prébourgeonnement. La formation de ce complexe de prébourgeonnement est la première étape d'engagement vers l'assemblage du revêtement.

LES PROTÉINES LIÉES AU GUANOSINE TRIPHOSPHATE

Toutes ces protéines partagent un domaine central identique qui fixe un nucléotide guanylique et qui utilise un cycle enzymatique pour passer de la forme active à la forme inactive.

La conformation déterminée par le GTP est active car elle interagit et stimule les effecteurs ; la conformation liée au GDP est inactive parce qu'elle ne peut pas lier d'effecteurs.

L'hydrolyse du GTP et la dissociation d'un phosphate convertit la GTPase de la forme active à la forme inactive. Par conséquent, la présence ou l'absence d'un γ -phosphate sur le GTP modifie l'état de la molécule.

Beaucoup de GTPases ont une forte affinité pour lier une guanine et hydrolyse le GTP lentement.

Elles s'accumulent sous leur forme inactive, liée au GDP, à moins que des récepteurs ou d'autres protéines accessoires ne catalysent la dissociation du GDP, permettant ainsi au GTP de se lier à nouveau et d'activer la protéine. Les GTPases restent ensuite actives jusqu'à ce qu'elles aient hydrolysé le GTP. Dans de nombreux cas, la liaison à des protéines effectrices ou à des protéines régulatrices accélère cette étape d'inactivation.

LE CYCLE DE BASE DE LA GTPASE

La liaison du GTP : elle est **rapide** et **prioritaire** par rapport au GDP car la concentration cytoplasmique de GTP est dix fois plus élevée que celle du GDP. La liaison du GTP active les GTPases en changeant la conformation de trois segments de la chaîne polypeptidique appelés switch-I, switch-II et switch-III. Le repliement de ces trois boucles autour du phosphate γ du GTP crée un site de liaison destiné à une protéine effectrice spécifique, comme une enzyme.

L'hydrolyse du GTP : elle est **irréversible** et **intrinsèquement lente**, avec des demi-vies mesurées en dizaines de secondes et jusqu'en heures selon la GTPase.

La dissociation du phosphate inorganique : elle est rapide et rétablit la conformation initiale en trois boucles switch. Cela inactive les GTPases en démantelant le site de liaison des protéines effectrices.

La dissociation du GDP : c'est **l'étape limitante** du cycle GTPasique. Les GTPases sous leur forme liée au GDP ne se lient pas et n'activent pas les effecteurs.

Les GTPases s'accumulent d'elles-mêmes à l'état GDP inactif. Le GTP ne peut pas se lier tant que le GDP n'a pas été dissocié. La plupart des GTPases dépendent d'autres protéines, appelées **facteurs d'échange du GDP** (GEF : *guanine nucleotide exchange factor*), pour accélérer l'étape limitante de dissociation du GDP. La plupart des GTPases dépendent également d'autres protéines ou de domaines accessoires intrinsèques pour stimuler l'hydrolyse du GTP et mettre fin à l'activation.

LA LIBERATION DES VESICULES

La synthèse doit être incluse dans la formation des conteneurs de transport contenant des chargements des éléments qui permettent de diriger la vésicule vers le compartiment suivant. Le ciblage est une tâche particulièrement difficile en raison de milliers de compartiments d'exocytose et d'endocytose intracellulaires. Un « complexe de ciblage » (TFC : *Targeting and Fusion Complex*) fonctionne comme un pilote qui a reçu des instructions spécifiques pour amener un avion rempli de passagers à une destination prévue. Bien sûr, cette destination doit être précise. Cette identification de la destination est due à un « complexe d'amarrage ». Ce complexe reconnaît la vésicule qui arrive et fonctionne ainsi comme un guide. Chaque étape de ce processus fait intervenir un ensemble complexe de protéines conservées au cours de l'évolution.

LA REGULATION DU SYSTEME DE LIBERATION PAR LES GTPASES RAB

La **famille Rab des GTPases** régule la libération des vésicules. Ces molécules fonctionnent comme des commutateurs qui règlent les interactions protéines-protéines pour former des **complexes de ciblage et d'ancrage**. Les cellules de mammifères expriment près de 60 protéines Rab différentes, qui contrôlent la diversité du trafic vésiculaire dans différents types cellulaires.

L'une des premières étapes de l'activité des protéines Rab après leur activation sous une forme liée au GTP consiste à **recruter les facteurs d'arrimage**.

MACHINERIE GENERALE DE CIBLAGE ET D'AMARRAGE PAR LES COMPLEXES SNARE

Outre le recrutement des facteurs d'arrimage, les GTPases Rab favorisent le recrutement de protéines appelées SNARE qui participent aux dernières étapes d'amarrage et de fusion vésiculaires. Les SNARE constituent une famille de protéines transmembranaires avec un domaine cytoplasmique contenant une région en superhélice et de petits domaines luminaux.

Au cours de la formation d'une vésicule, une GTPase Rab recrute un ensemble spécifique de SNAREs qui s'associent par leurs domaines en superhélice pour donner un domaine spécifique : l'appariement cis-SNARE.

L'interaction entre une vésicule et sa membrane cible par les molécules d'amarrage entraîne la formation de paires trans-SNARE reliées par des régions étendues de superhélices de la protéine SNARE. Après la constitution de la paire trans-SNARE, l'hydrolyse de Rab-GTP entraîne la fusion de la vésicule. La fusion vésiculaire nécessite une restructuration de la bicouche lipidique.

TRANSPORT ET RECYCLAGE DANS LE GOLGI

Après l'exportation du RE par les vésicules COPII, le chargement apparaît dans les intermédiaires prégolgiens qui sont acheminés vers les empilements sacculaires du Golgi. Le **recyclage des protéines transmembranaires** utilisées pour élaborer et cibler des vésicules vers le compartiment suivant est une **propriété commune à toutes les étapes du transport**. Par exemple, au cours du transport du RE vers le Golgi, les SNARE doivent être dissociées du chargement pour être recyclées tandis que le chargement poursuit son parcours dans l'appareil de Golgi. De plus, les protéines résidentes qui ont accidentellement échappé au RE doivent y être restituées.

Le recyclage des protéines à partir du Golgi vers le RE commence dans les intermédiaires prégolgiens et est réalisé par le **complexe de revêtement I** (COPI : *coatamer protein I*). Les éléments de COPI sont indépendants de COPII qui participe au bourgeonnement de la membrane du RE. COPI a vraisemblablement évolué pour apporter une solution originale qui équilibre la migration des protéines et des lipides, en formant des vésicules qui sélectionnent et concentrent les éléments de recyclage.

TRANSPORT RETROGRADE A PARTIR DU GOLGI PAR LES COPI

L'activation par le domaine Sec7 des GEF spécifiques, active Arf1-GDP en Arf1-GTP ; cela entraîne le recrutement couplé du chargement, des facteurs d'ancrage et de fusion vésiculaires (TFC) à la suite de la liaison du complexe cytoplasmique de revêtement COPI. Pendant ou après la fusion, Arf1 revient à sa forme inactive Arf1-GDP sous l'action de GAP spécifiques, ce qui entraîne la dissociation du réseau de revêtement et de la membrane et la libération de Arf1 et du complexe de revêtement dans le cytoplasme. Le chargement, les facteurs d'ancrage et de fusion restent avec les vésicules transportées vers le compartiment suivant.

LES SIGNAUX DE RECYCLAGE

L'incorporation des **facteurs de recyclage** dans les vésicules COPI nécessite la présence d'un **motif dilysine** répondant à la formule Lys-Lys-x-x-COOH (KKxx), dans laquelle x est un autre acide aminé. Les motifs dilysines sont généralement retrouvés en **C-term cytoplasmique des protéines transmembranaires**. Ces motifs interagissent avec des sous-unités spécifiques du complexe COPI et permettent de récupérer des protéines dans les compartiments situés au-delà du RE. En outre, le recrutement des protéines portant le signal KKxx apparaît en réponse à l'activation de la protéine Arf1-GTP.

Un signal de recyclage des **chargements solubles** a été également identifié. Ces protéines résidentes du RE partagent la même séquence C-term : Lys-Asp-Glu-Leu-COOH (**KDEL**). Les protéines résidentes qui ne comportent pas cette séquence sont **sécrétées lentement** hors de la cellule. **L'addition d'une séquence KDEL** à l'extrémité C-term d'une protéine normalement sécrétée par les cellules **entraîne sa rétention dans le RE**. Les protéines qui comportent une séquence KDEL et qui s'échappent du RE sont recyclées en se liant à un nouveau récepteur membranaire situé sur le versant cis de l'appareil de Golgi. La liaison de ce récepteur avec la protéine KDEL favorise l'assemblage d'un revêtement COPI et permet une capture efficace par les vésicules de transport rétrograde COPI.

MODELE DE MATURATION VECTORIELLE DANS LE TRANSPORT DES CHARGEMENTS VERS LES COMPARTIMENTS DU GOLGI

Chaque empilement de saccules n'est pas constitué de compartiments avec une composition fixe, elle varie constamment. Le Golgi est un organite très dynamique qui se maintient par une maturation vectorielle ou cisternale. Le versant cis de l'appareil de Golgi provient de la fusion homotypique d'intermédiaires pré-golgiens dérivés de conteneurs de transport sortant du RE avec un revêtement COPII. Ce nouveau compartiment est ensuite converti en un compartiment médian puis trans par le recyclage rétrograde des enzymes de traitement du Golgi. La configuration en pile de saccules du Golgi est donc la conséquence d'un apport constant de nouvelles structures membranaires provenant du RE sur le versant cis et du recyclage des éléments provenant des compartiments plus tardifs qui génère des modifications de composition dans la direction cis-trans. Le dernier compartiment trans du Golgi pourrait provenir en partie de la voie d'endocytose.

ROLE DU CYTOSQUELETTE DANS LE TRANSPORT DU RE VERS LE GOLGI

Dans les cellules animales, les organites et les transports intermédiaires sont souvent co-localisés au niveau des microtubules avec des mouvements allant ou partant du centre de la cellule ou le centrosome est localisé.

L'organisation du réseau de microtubules dans une culture de fibroblastes peut être visible grâce à un marqueur anti-tubuline immunofluorescent.

Les **microtubules** sont des **polymères de tubuline** formés d'une succession de dimères de tubuline α et β . Ces dimères de tubuline sont associés en protofilaments qui se replient entre eux pour former un large tube de 25 nm de diamètre. Ce sont des cylindres **construits à partir de protofilaments** orientés longitudinalement et constitués d'une répétition de 4nm de long formée par les sous-unités de tubuline. La plupart des microtubules cytoplasmiques possèdent 13 protofilaments. Les dimères de tubuline présentent une organisation asymétrique qui constitue la base des différences biochimiques entre les extrémités + et -. La β -tubuline est localisée à l'extrémité + qui s'allonge plus vite que l'extrémité α . **A l'état d'équilibre**, les MT s'allongent jusqu'à ce qu'ils passent de façon aléatoire vers une phase de raccourcissement rapide : c'est l'étape appelée **catastrophe** qui est interrompue par l'étape de **sauvetage** durant laquelle le MT s'allonge de nouveau. Le **marquage fluorescent** de la tubuline peut être fait par la rhodamine ou par fusion de l' α -tubuline avec de la GFP. Ce marquage a permis d'observer la dynamique des MT dans les cellules : malgré des catastrophes fréquentes, les MT sont généralement longs parce que les chances de sauvetage sont grandes.

Les **centrosomes** sont les sites principaux de la nucléation des MT dans les cellules. Ils sont composés de deux centrioles constitués de 9 triplets de petits MT et dupliqués durant la phase S du cycle cellulaire. Dans la cellule, l'extrémité - des microtubules est concentrée au centrosome.

La **répartition du RE** dépend des MT intacts : les protéines motrices peuvent transporter les tubules du RE sur les MT ou bien les tubules peuvent s'attacher à l'extrémité + des MT et parcourent l'extrémité du MT en même temps que celui-ci s'allonge.

La plupart des kinésines et la dynéine cytoplasmique se déplacent le long des MT. Des tests de motilité in vitro ont mis en évidence la capacité de la dynéine et de la kinésine purifiées de se déplacer le long des MT. Les dynéines se déplacent elles-mêmes ainsi que tout le chargement vers l'extrémité - des MTs. La plupart des kinésines se déplacent dans la direction opposée. La kinésine porte deux têtes qui se lient au MT alors que la dynéine se fixe au MT grâce à une boucle dans sa chaîne lourde.

BIOLOGIE CELLULAIRE

RESEAU TRANS-GOLGIEN ET FIN DE LA VOIE DE SECRETION

INTRODUCTION

Le TGN est le **premier centre de triage** de la voie de biosynthèse. Plusieurs mécanismes existent pour permettre un acheminement correct des différents chargements vers les **différentes destinations intracellulaires**.

DIVERGENCE DES CHARGEMENTS DE BIOSYNTHESE/EXOCYTOSE AU NIVEAU DU TGN

Le chargement destiné à la sécrétion ou à des sites intracellulaires différents est trié et conditionné dans des **vésicules de transport distinctes**. La **configuration géométrique des tubules/vésicules** du TGN joue un rôle dans le tri des protéines.

LES SIGNAUX DE TRI

L'itinéraire intracellulaire de chaque protéine est déterminé par des signaux de tri contenus dans la chaîne polypeptidique. Le tri et le conditionnement entre les différentes classes de vésicules de transport reposent sur trois mécanismes qui fonctionnent **isolément ou en association** :

- **Le tri en fonction de motifs** repose sur la reconnaissance d'enchaînements d'acides aminés et/ou de glucides par les éléments de ma machinerie de tri.
- **Le tri en fonction des propriétés physiques** intervient dans le conditionnement de classes de protéines dans les vésicules de transport. Par exemple les protéines membranaires qui partagent une affinité avec certaines espèces lipidiques et/ou le cholestérol sont regroupées dans des sous domaines de la membrane appelés des **radeaux lipidiques** qui forment des vésicules ciblées vers des domaines particuliers de la membrane plasmique. La tendance des protéines sécrétoires à **s'agréger** entre elles dans un milieu légèrement acide du TGN facilite leur conditionnement dans de volumineux grains de sécrétion émanant du TGN et empêchent leur incorporation dans des vésicules ou des tubules plus petits.
- **Le tri en fonction de la configuration spatiale** fait intervenir le rapport entre la surface et le volume de la vésicule ou du tubule de transport et du compartiment de tri. De nombreux compartiments de tri ont une structure **tubulovésiculaire** : il en est ainsi avec le TGN, les endosomes et des compartiments intermédiaires entre RE et Golgi. Les **segments tubulaires** des compartiments de tri ont un rapport **surface/volume élevé** tandis que celui-ci est très **faible dans les vacuoles**. Pour des raisons strictement géométriques, le contenu luminal se collecte dans les segments riches en vacuoles tandis que le contenu lié à la membrane se répartit dans les segments tubulaires. Dans de nombreux cas, les **segments tubulaires** des compartiments de tri participent au **recyclage** membranaire, tandis que les **segments vacuolaires** livrent leur chargement luminal à la **destination suivante**. Associés aux mécanismes sélectifs de rétention et d'exclusion des segments tubulaires ou vacuolaires, ces facteurs géométriques permettent un **tri efficace**.

TRI ITERATIF

Les protéines comportent souvent **plusieurs motifs de tri** qui, en association avec les propriétés physiques de la protéine et en fonction de l'environnement luminal, peuvent dicter un **itinéraire intracellulaire complexe** qui dépend de la hiérarchie des interactions et des reconnaissances dans différents sites cellulaires. Les mécanismes de tri sont rarement efficaces à 100% au bout d'un seul cycle. C'est pourquoi les itinéraires complexes des protéines membranaires font intervenir **plusieurs étapes de tri couplées** en série pour permettre un tri efficace. Au cours de ce processus appelé **tri itératif**, l'efficacité des tris séquentiels est cumulée.

BIOGENESE DES LYSOSOMES

Les hydrolases lysosomales sont impliquées dans la dégradation de protéines et leur accumulation dans les lysosomes. Elles sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs de haut poids moléculaire appelés prohydrolases.

Après leur transfert dans un site précoce du Golgi, les prohydrolases sont des substrats uniques de deux enzymes séquentiels qui génèrent le signal de ciblage lysosomal : **dans le RE**, la première enzyme (UDP-GlcNAc-1-phosphotransférase) transfère les résidus phospho-GlcNAc à la chaîne oligosaccharidique avant que la protéine soit transportée dans l'appareil de Golgi ; **dans le réseau cis-Golgien**, les mannosidases élaguent le cœur de mannose et l'enzyme 2 (GlcNAc-1-phosphodiester β -N-acétylglucosaminidase) donne naissance aux groupes terminaux de mannose-6-phosphate reconnus par les **récepteurs du mannose-6-phosphate (MPR)**.

Ils existent **deux classes de MPR** chez les mammifères : le **grand récepteur** est constitué de plusieurs unités répétitives et fixe les ligands indépendamment des cations ; le **petit récepteur** fixe les ligands en présence de cations uniquement. Les MPR s'accumulent dans le TGN.

Les **puits à clathrine** ont été découverts dans l'endocytose de récepteurs de la membrane plasmique. Les MPR et les prohydrolases quittent le TGN grâce à ces puits à clathrine. L'assemblage du revêtement et le recrutement du cargo sont coordonnés et induits par l'activation d'Arf1 par un facteur d'échange spécifique au TGN.

MEMBRANES LYSOSOMALES

Les membranes lysosomales ont une composition phospholipidique originale qui comporte du cholestérol et un lipide particulier appelé acide lysobisphosphatidique contenant un squelette de deux molécules de glycérol liées l'une à l'autre et deux chaînes acylées. Elles possèdent aussi des protéines transmembranaires particulières Lamp1, 2 et 3 et LimpII. Elles sont caractérisées par la présence de chaînes carbonées à haut poids moléculaire. Ces protéines possèdent un court domaine cytoplasmique avec tous les signaux de tri nécessaires pour conditionner des vésicules dans le TGN et les cibler vers les lysosomes/endosomes.

LA VOIE DE SECRETION REGULEE

Ce mécanisme permet de libérer la plupart des hormones polypeptidiques de l'organisme, les enzymes du tube digestif et de nombreux autres produits qui sont utilisés de façon intermittente plutôt que continue.

Maturation d'une vacuole de condensation : la pompe H^+ -ATPase vacuolaire dans la membrane des grains de sécrétion (GS) diminue le pH dans la lumière. Cette **baisse du pH** entraîne une condensation et une concentration du contenu. Les **granules de sécrétion matures** à cœur dense sont **stockées** dans le cytoplasme **jusqu'à ce qu'un signal déclenché par le Ca^{2+} provoque la fusion** et la libération de leur contenu. Les

protéines incorporées par erreur dans les volumineux grains sécrétoires immatures provenant du TGN sont captées par les vésicules revêtues de clathrine et recyclées vers les endosomes et le TGN.

MATURATION DES PRO-HORMONES

Les hormones polypeptidiques telles que l'insuline sont synthétisées dans le RE comme pro-hormones. La pro-insuline et l'insuline peuvent être détectées par un immuno-marquage.

REGULATION DE LA FUSION AVEC LA MEMBRANE PLASMIQUE

Les quatre étapes terminales de la fusion membranaire déclenchée par le Ca^{2+} au cours de la sécrétion régulée. Les mécanismes des étapes d'arrimage/ancrage et de fusion est comparable à celui des autres processus de fusion vésiculaire. Les autres étapes préparent des protéines des vésicules sécrétoires de la membrane plasmique à une réponse rapide à l'entrée du Ca^{2+} qui déclenche la fusion.