Le principe de la fusion membranaire dans la cellule^{*}

James Edward Rothman

Yale University, New Haven, CT 06520, USA

Auteur correspondant : James Edward Rothman, james.rothman@yale.edu

En 1970, le travail déjà classique de George Palade (Prix Nobel 1974, figure 1) avait montré que les protéines sécrétées sont transportées du réticulum endoplasmique (RE) à la surface cellulaire dans des organites spécialisés, dits vésicules de transport, qui bourgeonnent d'une membrane et fusionnent à la suivante, traversant au passage l'appareil de Golgi (figure 2). Nous savons maintenant que ce transport protéique intracellulaire est un processus universel chez tous les eukaryotes. Toutes sortes de vésicules voyagent dans la cellule, chargées de différents contenus à convoier. Il en résulte un programme chorégraphié, grâce auquel un transit de protéines sécrétoires, biosynthétisées et/ou endocytosées répond aux besoins physiologiques internes de la cellule, adapte son organisation interne et lui permet de communiquer avec le monde extérieur en recevant nutriments et signaux.

Tout processus de transfert de vésicules peut être considéré comme comportant deux étapes de base : un bourgeonnement (lorsque la vésicule se sépare d'une membrane « donneuse ») et une fusion (lorsque la membrane de la vésicule se fond à la membrane « acceptrice » de la cible visée). Le processus de fusion membranaire a une importance particulière pour la physiologie intracellulaire comme extracellulaire (figure 3). La fusion des vésicules à l'intérieur de la cellule doit être réalisée avec une spécificité exquise pour éviter qu'un organe n'accapare les propriétés fonctionnelles d'un autre. La fusion à la membrane plasmique (exocytose) provoque la libération du contenu de la vésicule, presque toujours constitué de substances très actives, et doit donc être régulée avec une grande précision. L'exocytose est mise en œuvre par presque toutes les cellules et tous les tissus de l'organisme. L'assortiment étourdissant de molécules signalisatrices rassemble des éléments importants de la physiologie et, fréquemment, des maladies qui lui sont

George E. Palade (1912-2008)
Yale University, Nobel Prize (1974)

Fig. 1. George E. Palade, considéré comme le fondateur de la biologie cellulaire moderne, a reçu le Prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 1974. Il était alors à l'Université de Yale, où il a fondé le Département de Biologie Cellulaire (dénomination d'aujourd'hui), que je présidais lorsque j'ai reçu le Prix Nobel.

Fig. 2. Le concept de transport intracellulaire, tel qu'il est décrit par Palade dans son discours Nobel (1974). Les questions fondamentales encore ouvertes comprenaient la manière dont les vésicules de transport se forment, comment elles peuvent fusionner spécifiquement à leurs membranes cibles pour délivrer leur contenu au bon endroit et au bon moment. Cette figure est reproduite du discours Nobel publié (Palade, 1975).

^{*} La Fondation Nobel (www.Nobelprize.org) nous a autorisés à publier cette traduction de la conférence donnée par le Pr. Rothman lors de la remise du Prix Nobel 2013. Nous l'en remercions vivement ainsi que le Pr. Rothman. Les figures ont été reproduites dans la version originale de la conférence Nobel et les légendes y sont donc en anglais.

Vesicle Fusion – The Delivery Process

Fig. 3. La fusion membranaire est le mécanisme de base qui assure l'adressage spécifique du contenu des vésicules. La fusion de vésicules transportant différents contenus sous-tend une importante variété de processus fondamentaux de la cellule et de la physiologie de l'organisme, allant de la distribution d'ensembles spécifiques de protéines à des compartiments du cytoplasme y compris les récepteurs de la membrane plasmique (croissance et division cellulaire, panneau en haut à gauche), à la sécrétion d'hormones et d'autres molécules de signalisation (physiologie endocrine et exocrine, panneau central du haut), et à la transmission synaptique (panneau du haut à droite), cas particulier de la communication intercellulaire. Des micrographies électroniques (panneaux du bas) montrent les vésicules de transport intermédiaires entre le RE et le Golgi à une étape précoce de la voie de sécrétion (cellules du pancréas exocrine), des vésicules de stockage sécrétoires plus grosses contenant de l'insuline avant et après la fusion (cellules β du pancréas endocrine) et les vésicules synaptiques (contenant des neurotransmetteurs) avant (en haut-1-) et après (en bas-2-) que la libération a été déclenchée par une variation du potentiel de membrane (cas de la jonction neuromusculaire).

liées : les neurotransmetteurs et les canaux ioniques de leurs récepteurs, les hormones comme l'insuline, les transporteurs de glucose et d'autres nutriments, les médiateurs systémiques tels que l'histamine et l'adrénaline, les facteurs de croissance et tant d'autres.

Dressons la scène

D'aussi loin que je puisse me souvenir, j'ai voulu devenir scientifique, et plus spécialement physicien. Je ne sais d'où c'est venu. Certainement en partie d'une famille qui accordait une haute valeur à l'éducation et particulièrement à la science et à la médecine. Ma mère Gloria, avec ses immenses capacités et son énergie, serait dans le monde d'aujourd'hui une dirigeante de haut vol. Elle faisait tourner la maison et la patientèle pédiatrique de mon père et m'enseigna entre autres comment organiser et diriger. Mon père Martin

était un intellectuel, médecin dans une petite ville, qui avait voulu se consacrer à la recherche médicale dans sa jeunesse, mais avait obtenu son diplôme pendant la Grande Dépression et été pris dans la tourmente de la deuxième guerre mondiale. Il désirait toujours m'impliquer dans ses entreprises. À l'âge de dix ans peut-être, je me rappelle l'avoir accompagné dans des visites nocturnes à des patients, quelquefois à l'hôpital, l'avoir assisté dans la mesure des intervalles QT sur les électrocardiogrammes, et l'avoir aidé à faire des analyses de sang dans le laboratoire derrière son bureau.

Cependant je pense que mon intérêt pour la science fut nourri au moins autant de l'écosystème dans lequel j'ai grandi. Dans les années 1950 et 1960, après la victoire de la deuxième guerre mondiale, la science et la technologie étaient considérées viscéralement par les américains comme les piliers du pouvoir économique

Fig. 4. La période 1950–1965, pendant laquelle j’ai grandi, était à beaucoup d’égards, l’apogée de la période de la physique. L’ère de la biologie avait commencé mais n’était pas encore complètement épanouie. En haut à gauche, Jonas Salk qui a réussi à produire le premier vaccin contre la polyomyélite. En bas à gauche les physiciens Albert Einstein et J. Robert Oppenheimer à l’aube de l’énergie nucléaire. À droite, l’astronaute de Mercury, Alan Shepard, se préparant pour le lancement.

et politique. Cette ère avait commencé avec le vaccin contre la polio éradicant une maladie redoutée, et avec l’énergie atomique (pour le meilleur et pour le pire). Elle se termina avec le transistor, l’ordinateur et les premiers pas des hommes sur la lune. Les scientifiques et les praticiens les plus connus, Salk, Einstein, Oppenheimer et les premiers astronautes, étaient des héros publics (figure 4).

Dans un tel écosystème, avec une famille qui me soutenait et un talent précoce pour les mathématiques, il aurait été étonnant que je n’aie pas commencé à construire des machines électroniques et à envoyer des fusées dans l’espace alors que j’étais encore à l’école primaire (figure 5). Les fusées m’excitaient tout particulièrement. J’ai appris tout seul la trigonométrie de base de manière à pouvoir calculer par triangulation l’altitude des fusées, et un peu plus tard le calcul infinitésimal pour mieux comprendre la physique impliquée. Lorsque j’ai étudié la physique et les mathématiques à l’Université et plus tard, je dévorais le sujet et étendais mes lectures bien au-delà du niveau exigé dans mon lycée (l’école Pomfret), à telle enseigne que je passais le diplôme final à la fin de l’année de junior. En entrant à Yale en 1967, j’étais absolument promis à la physique théorique.

Bien qu’elle n’ait pas été au bout de mon parcours, la physique m’a appris comment analyser de manière rigoureuse les composants d’un problème, en imaginant d’abord la forme qu’en prendrait la solution. Cela peut être une approche utile, lorsqu’on est englué dans le brouillard qui enveloppe les eaux non

Fig. 5. L’auteur, deuxième à droite, se préparant à lancer une maquette de fusée à l’âge de 12 ans. J’étais en extase devant les mathématiques, la physique et la technologie.

explorées de la biologie. Une conversion presque instantanée et de dernière minute (à la suite d’une suggestion insistante de mon père pour que j’essaie plutôt la biologie) eut lieu pendant mon année de junior à Yale. Dès la première conférence du cours de biologie générale (donné par le charismatique et brillant biophysicien Frederic Richards), je fus sidéré par le fait que – contrairement au domaine hautement structuré de la physique – la recherche de pointe en biologie moléculaire me paraissait instantanément accessible, tout en étant aussi rigoureuse et basée sur les structures.

Une série de hasards me conduisit ensuite vers Donald Engelman, à l’époque nouveau professeur assistant de biophysique à Yale, si bien que mon premier contact avec la science expérimentale vint de la biophysique des membranes. Yale m’autorisa à laisser tomber tout travail de cours formel (tout en me permettant d’obtenir le diplôme ; ce qui n’est plus admis aujourd’hui...) pour me consacrer à plein temps à la recherche ; je leur en serai toujours reconnaissant. Cette année-là, j’appris d’Engelman comment disséquer chaque miette de données pour en tirer le maximum, et je devins chercheur. Ensuite j’entrais à l’École de Médecine de Harvard (en 1971) avec l’idée d’apprendre la biologie générale plutôt que de pratiquer la médecine. J’y réussis, abandonnant plus ou moins le programme médical après les matières de base (je fus cependant assez exposé à la clinique pour en garder toute ma vie le respect de la médecine clinique).

Ce fut comme étudiant en médecine de première année en histologie que je fus initié à la voie sécrétoire à une époque où les remarquables découvertes de George Palade étaient récentes et remarquables. Quel processus étonnant – comment les cellules pouvaient-elles fabriquer des vésicules à partir des membranes ?

**Eugene Patrick Kennedy
(1919 – 2011)**

Fig. 6. Mon directeur de thèse, Gene Kennedy, un maître de la biochimie des membranes.

Comment chaque vésicule savait-elle où aller ? Comment pouvait-elle fusionner ? C'était particulièrement stupéfiant parce que, à cette époque, il était impossible de commencer à imaginer une éventuelle solution moléculaire. Cela frappa mon imagination, mais on n'en savait pas assez pour attaquer le problème de manière productive.

Ma thèse de PhD (partie du programme MD-PhD de Harvard) avec Eugene Kennedy, un maître de la biochimie des membranes (figure 6), à l'École de Médecine de Harvard, établit que la bicouche lipidique se forme par biosynthèse asymétrique. Kennedy, brillant intellectuel et penseur original, m'apprit comment formuler un problème complexe en termes biochimiques.

Les éléments clés pour une découverte

En regardant en arrière, il est facile de voir que beaucoup d'éléments se combinèrent favorablement pour me permettre de faire les découvertes aujourd'hui reconnues par un Prix Nobel. J'ai abordé le problème du tri à la fin des années 1970 avec des acquis étrangers au domaine, qui se révélèrent pourtant utiles en eux-mêmes mais qui me laissaient assez ingénu pour que je n'aie aucune inhibition. Ma formation et les possibilités (déjà évoquées) dont j'étais équipé comme jeune scientifique constituaient d'autres facteurs clés ; l'environnement de travail dans un département encourageait la prise de risques ; des financements de recherches fédéraux, stables pendant une décennie, permettaient l'innovation ; le choix astucieux du problème (au bon moment, c'est à dire encore difficile mais pas impossible, et cependant susceptible d'impact) ; une manière d'approcher le problème unique et productive (dans mon cas un outillage intellectuel simplificateur issu de la chimie physique, comme je le décrirai) ; des étudiants adaptés (et brillants) aux bons moments ; et

**Arthur Kornberg (1918- 2007)
Stanford University, Nobel Prize (1959)**

Fig. 7. Arthur Kornberg, un maître de l'enzymologie, a fondé le Département de Biochimie à l'Université de Stanford et en était encore le vrai leader, lorsque j'y suis entré comme professeur assistant en 1978. Dans le laboratoire voisin, il m'a enseigné par l'exemple comment un grand scientifique, armé des idées de Buchner, pouvait attaquer un processus biologique complexe.

bien sûr un travail acharné et une grande opiniâtreté à développer des techniques efficaces, malgré de nombreux et pénibles échecs.

En premier lieu, l'environnement de travail idéal

J'eus la bonne fortune de recevoir la proposition d'entrer au département de biochimie de Stanford, alors que j'étais encore étudiant en médecine ; je ne pus laisser passer cette occasion, qui était la chance exceptionnelle de commencer ma propre recherche dans l'environnement remarquable créé par Arthur Kornberg, l'un des grands biochimistes du 20^{ème} siècle (figure 7). Heureusement Stanford voulut bien me réserver une bourse postdoctorale pendant un an ; si bien que j'ai quitté l'École de Médecine de Harvard (avec un PhD) en 1976 pour le MIT et Harvey Lodish, avec Stanford en perspective. Lodish m'apprit à travailler sur des systèmes acellulaires complexes (translocations à travers des membranes couplées à la synthèse de protéines) et, pour tout dire, me montra comment un grand laboratoire peut être dirigé audacieusement et énergiquement.

Lorsque j'emménageai à Stanford à l'été 1978, une nouvelle période de mon apprentissage scientifique commença. Je reçus de Kornberg deux enseignements critiques à un moment critique : comment formuler une stratégie pour la dissection biochimique réussie d'un système complexe ; et la conviction profonde que, quelle que soit la complexité du problème, la biochimie aboutirait (éventuellement) et donnerait effectivement la seule clé efficace pour accéder aux mécanismes moléculaires sous-jacents. Les prêches de Kornberg sur ce thème étaient convaincants parce qu'ils reposaient sur un terrain solide. Après tout, la reconstitution en milieu acellulaire avait été l'approche expérimentale centrale de toute la biochimie

Eduard Buchner (1860-1917)

Nobel Prize (1907) "for his discovery of cell-free fermentation" dispelling vitalism, firmly rooting biology in chemistry

"We are seeing cells more and more clearly as chemical factories, where the various products are manufactured in separate workshops, the enzymes act[ing] as the overseers" - Nobel Lecture (1907)

Fig. 8. Eduard Buchner peut être considéré comme le fondateur de la biochimie moderne. « Prix Nobel (1907) pour sa découverte de la fermentation acellulaire » qui a éliminé le vitalisme et ancré la biologie dans la chimie. « *Nous voyons de plus en plus clairement les cellules comme des usines chimiques, dont les produits variés sont manufacturés dans des ateliers séparés, dont les enzymes sont les surveillants* ». Conférence Nobel (1907).

depuis ses débuts, avec la découverte, à la fin du 19^e siècle, de la fermentation alcoolique en présence d'extraits de levure par Edouard Buchner (Prix Nobel 1907), qui fonda ainsi ce qui devint la biochimie moderne. Et à la fin des années 1970, les principes fondamentaux de la synthèse d'ATP, de la réplication de l'ADN, de la transcription de l'ARN, de la synthèse des protéines et même du code génétique, étaient tous des « victoires » relativement récentes de l'approche de reconstitution, qui fait disparaître efficacement les subtilités de la régulation physiologique pour mettre au jour la robuste machinerie centrale.

Le choix du bon problème au bon moment

Se focaliser précisément sur l'aspect central, plutôt que périphérique d'un problème, alors qu'il est consensuel et mûr pour une approche adéquate. Comme je l'ai noté plus haut, dès le début des années 1970 et alors seulement étudiant en médecine, j'étais déjà fasciné par le « problème du tri » (comme on l'appelait alors – à savoir comment les protéines nouvellement synthétisées se distribuaient des ribosomes vers leurs destinations spécifiques dans la cellule), un problème qui ne devint abordable que dix ans plus tard. La situation changea dramatiquement à la suite de plusieurs découvertes clés qui, ensemble, permirent de poser le problème du tri en termes beaucoup plus précis. Günter Blobel (Prix Nobel 1999) avait alors trouvé que ces protéines portent des signaux incorporés qui les dirigent vers le RE et, par implication, que les

protéines ont d'une manière générale des séquences signal qui spécifient leur localisation dans la cellule ; il s'agit maintenant d'un principe de base. Élucidant les mécanismes fondamentaux de l'homéostasie du cholestérol, Michael Brown et Joseph Goldstein (Prix Nobel 1985) venaient de démontrer très clairement que le transport sélectif entre les compartiments cellulaires est exécuté par des vésicules et qu'il implique des récepteurs spécifiques de ces signaux dans la cargaison (particules de LDL ou *Low Density Lipoproteins*). Ils trouvèrent que les « *coated vesicles* », découvertes par le grand morphologiste Keith Porter en 1964 (Roth & Porter 1964), et purifiées pour la première fois par Barbara Pearse en 1976 (Pearse, 1976), bourgeonnaient à partir de la membrane plasmique et ils mettaient aussi en évidence la première protéine qui les recouvrait, la clathrine. Les vésicules recouvertes de clathrine effectuent l'endocytose des lipoprotéines du plasma, permettant le relargage de leur cholestérol dans les lysosomes pour sa réutilisation par la cellule. Ces vésicules engrangent les lipoprotéines du milieu à l'aide d'un récepteur (récepteur des LDL) localisé dans les régions à clathrine de la membrane impliquées dans le bourgeonnement. À la suite de tout cela, il devint évident que la solution du problème du tri demandait surtout de comprendre comment chaque type de vésicule vise la cible membranaire correcte dans la cellule et y fusionne.

Une manière unique d'aborder le problème

L'équipement intellectuel d'un physicien, appliqué aux complexités et aux mystères de la biologie cellulaire, m'ouvrait cette perspective et l'approche pour travailler le problème. Les physiciens cherchent à expliquer tous les processus apparentés sur une base commune à l'aide de lois universelles, et y arrivent en formulant une hypothèse *a minima*. L'opinion dominante parmi les biologistes était alors sans aucun doute que l'organisation anatomique du système endomembranaire dans la cellule est cruciale pour la livraison de la cargaison – par exemple le fait que le RE de transition (à partir duquel des vésicules bourgeonnent pour transporter les produits de sécrétion vers le Golgi) est placé à côté du Golgi. Comme on le voit dans la figure 9, à gauche, dans une micrographie classique de Palade, le RE semble quasiment « gaver » des vésicules vers l'entrée (côté *cis*) de l'empilement des saccules golgiens, soutenant donc l'idée que l'anatomie dicte la spécificité ; mais l'idée la plus simple est plutôt l'idée inverse – qu'une spécificité chimique intrinsèque permet la livraison du contenu et que l'anatomie observée est une conséquence de la spécificité chimique en action (figure 9, à droite).

L'idée plus commune et plus complexe, selon laquelle l'anatomie dicte la spécificité, signifierait qu'un

The simplest hypothesis: Intrinsic chemical specificity governs transport, not intracellular anatomy

Fig. 9. Mon raisonnement de 1978, d'après lequel la stratégie de reconstitution acellulaire a été modélisée. Le modèle, en bas à droite (publié dans les *Cold Spring Harbor Symposia* sur la Biologie Quantitative de 1982, Volume XLVI) a été dessiné bien longtemps avant que la machinerie protéique soit connue. La logique organisationnelle des étapes était correcte, alors que les protéines responsables (encore hypothétiques) n'étaient pas connues. À gauche, cellules du pancréas exocrine en microscopie électronique montrant les vésicules de transport intermédiaires entre le RE et le Golgi à une étape précoce de la voie de sécrétion (cf. figure 3).

trafic de vésicules correct ne pourrait avoir lieu en l'absence d'une organisation cellulaire préexistante. Ce préjugé puissant – fermement enraciné dans la biologie cellulaire dès son origine comme branche de l'anatomie microscopique – explique sans aucun doute une part importante du scepticisme avec lequel notre expérience de reconstitution fut accueillie pendant des années.

D'un autre côté, la grande qualité de l'idée la plus simple est la remarquable prédiction qu'elle permet : le trafic vésiculaire correct peut en principe avoir lieu dans des extraits acellulaires, ce qui ouvrirait la porte à une enzymologie de style Kornberg. Une fois reconstitué, le transport acellulaire pourrait servir de test pour identifier les protéines enzymatiques sous-jacentes et pour les purifier d'après leurs propriétés fonctionnelles.

Finalement, le bon partenaire pour attaquer le problème fut mon premier étudiant postdoctoral, Erik Fried (figure 10, à gauche). Erik, un jeune scientifique suédois, tout juste arrivé à Stanford, venait du nouveau laboratoire européen de Biologie moléculaire à Heidelberg, en Allemagne. Erik avait travaillé avec Ari Helenius et Kai Simons, et avait apporté ce capital de discernement critique qui les avait conduits à la découverte du mécanisme de l'entrée des virus dans les cellules. Erik apporta donc avec lui une compréhension approfondie à la fois de la biologie de la cellule et de

Fig. 10. À gauche, l'homogénéisateur de Dounce, utilisé par mon premier collaborateur post-doctorant Erik Fries et moi-même en 1979 pour reconstituer avec succès le transport « intracellulaire » dans un extrait acellulaire, maintenant conservé dans le Musée Nobel. À l'origine, il avait été monté comme cadeau de départ à Erik (photographié à cette époque, à droite). Erik est maintenant Professeur à l'Université d'Uppsala et j'ai eu le plaisir de le présenter lors de mon discours Nobel.

la biochimie physique ainsi que sa propre approche rigoureuse et quantitative. Il possédait aussi la rare combinaison d'un esprit à la fois aventureux et obstiné ; cela le rendait capable de recruter des adeptes pour des projets que presque tout le monde considérait comme des efforts voués à l'échec.

Fig. 11. La voie de modification dans le Golgi des chaînes d'oligosaccharides liées à l'asparagine de la glycoprotéine dérivée du RE, élucidée en 1976–1978, essentiellement par Stuart Kornfeld. Les complexes liés à l'asparagine deviennent résistants au clivage par l'endoglycosidase H après addition de N-acétylglucosamine par la GlcNAc transférase I, suivie de la libération de résidus mannose par la Golgi mannosidase II dans le Golgi médian.

La reconstitution du transport vésiculaire en milieu acellulaire

Notre but était donc de détecter dans un milieu acellulaire le transport d'une protéine entre des compartiments limités par des membranes. Comme il n'était pas encore possible d'exprimer des gènes clonés dans des cellules animales, nous avons étudié le transport d'une glycoprotéine membranaire (la protéine G), exprimée en abondance pendant l'infection par le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), un système alors à la mode que j'avais appris dans le laboratoire d'Harvey Lodish. La modification des chaînes d'oligosaccharides de la protéine G pendant le transit intragolgien fournissait également l'outil biochimique indispensable pour suivre le transport éventuel dans les homogénats. Le trajet détaillé le long duquel les chaînes oligosaccharidiques liées à l'asparagine mûrissent au cours du *processing* venait d'être découvert par Stuart Kornfeld et d'autres.

Comme on le voit dans la figure 11, la modification des oligosaccharides comporte l'addition initiale d'un oligosaccharide précurseur à la protéine dans le

RE, suivie par la suppression séquentielle de certains résidus glucose et mannose, puis l'addition de sucres « terminaux » N-acétyl-glucosamine (GlcNAc), galactose et acide sialique, à des sites successifs dans les saccules golgiens. Philipps Robbins venait de décrire un raccourci élégant pour suivre la modification des saccharides à l'aide de gels SDS-protéines, exploitant une endoglycosidase bactérienne (Endo H) qui clive le précurseur et les chaînes saccharidiques immatures caractéristiques du RE et du Golgi précoce, mais qui ne peut cliver les chaînes matures contenant GlcNAc ou d'autres sucres terminaux rajoutés plus tard dans le Golgi. Puisque la chaîne saccharidique (excepté l'unique GlcNAc interne qui est lié directement à l'asparagine) est enlevée, le poids moléculaire d'ensemble de la glycoprotéine est réduit de manière significative et sa bande migre sur un gel SDS à la position Gs. Lorsqu'une partie seulement de la population de protéines G est entrée et a été traitée dans le Golgi, deux bandes sont observées : la bande parente (Gr, résistante à l'Endo H) et la bande migrée (Gs, sensible à l'Endo H). Les méthodes précédentes pour l'analyse des chaînes de saccharides impliquaient des

Fig. 12. La méthode de « complémentation » qui a réussi *in fine*. Test du transport de la protéine G du VSV (*Vesicular Stomatitis Virus*). Les cellules 15B n'ont pas de GlcNAc transférase I. Par conséquent, les protéines de ces cellules n'acquièrent jamais de résistance à l'endo-H, bien qu'elles transitent à travers la voie de sécrétion. Pour tester le transport, la fraction contenant le Golgi isolé de cellules 15B infectées par le VSV (radio-marquées) est incubée avec la fraction golgienne de cellules sauvages non infectées (avec de l'ATP et du cytosol). L'acquisition de la résistance à l'endo-H par la protéine G mesure l'ampleur de son transfert des compartiments donneurs au Golgi médian. Le cercle à paroi rouge symbolise la vésicule de transport entre deux saccules golgiens dont nous avons supposé qu'elle bourgeonnait et fusionnait pour rendre compte de nos résultats.

étapes multiples de fragmentation et de chromatographie et demandaient plusieurs jours; elles étaient envisageables pour le test enzymatique de routine que nous espérions mettre au point pour la reconstitution du transport.

Erik commença par un radio-marquage à la méthionine S35 de cellules de hamster infectées par le VSV, pendant un temps dont nous savions qu'il serait suffisant (environ 5 min) pour permettre à toute la protéine nouvellement synthétisée d'entrer dans le RE, mais pas ou très peu dans le Golgi. Ensuite nous avons broyé les cellules (avec le célèbre homogénéiseur de Dounce, montré sur la figure 10 à gauche), puis incubé l'homogénat avec de l'ATP, et déterminé si une partie de la protéine G Endo H-sensible présente dans le RE au début de l'incubation acellulaire était devenue Endo H-résistante (ce qui aurait indiqué un transport du RE vers le Golgi).

Or peu, si ce n'est pas du tout, de Gr fut produite. Lorsque nous avons prolongé le temps de marquage, un signal faible (Gr produite dans l'homogénat) est cependant apparu, mais il était rapidement éclipsé par la quantité toujours croissante de Gr présente dans l'homogénat au début de l'incubation acellulaire, puisque des quantités croissantes de protéine G étaient entrées dans le Golgi de la cellule avant le broyage. Aucun bricolage des conditions acellulaires n'améliora ce résultat. Pire même, nous n'étions pas sûrs que notre petit signal représentait bien un transport qui aurait eu lieu dans l'homogénat. La Gr en trop produite *in vitro* aurait pu tout simplement provenir de l'achèvement de la modification de la protéine G qui avait déjà atteint le Golgi avant le broyage des cellules.

Affronter cette impasse conduisit à une percée. Je réalisais qu'une lignée de cellules de hamster mutante (clone 15B), déficiente pour une étape spécifique de

la glycosylation dans le Golgi, pouvait être soumise à une variante de l'expérience ci-dessus, à la fois pour éliminer le bruit de fond de la protéine G Endo H-résistante au début de l'incubation et pour assurer que toute glycosylation pendant l'incubation ne pouvait résulter que du transport. Ce mutant, le clone 15B, avait été isolé grâce à sa résistance à une lectine végétale habituellement toxique. Il lui manque l'enzyme *N*-Acétyl-Glucosamine Transférase I (NAGT-I; également connue comme GlcNAc transférase), normalement présente dans les citernes golgiennes centrales (figure 11). En conséquence, les cellules 15B ne peuvent amener la protéine G à l'Endo H-résistance, alors qu'elles peuvent tout de même transporter normalement la protéine G partiellement maturée vers la surface cellulaire. La protéine G reste donc Endo H-sensible dans le RE, le Golgi, et la membrane plasmique des cellules 15B. Si bien que, lorsque des homogénats de cellules 15B marquées à la méthionine S35 et infectées par le VSV sont incubées, la protéine G de leurs membranes reste toujours Endo H-sensible, même si ces dernières doivent subir un transport ultérieur.

Le changement critique (figure 12) consistait simplement à incubier les deux homogénats ensemble – l'un produit à partir de cellules mutantes 15B infectées par le VSV (le « donneur »), et l'autre produit à partir de cellules sauvages non infectées (l'« accepteur »). La protéine Endo H sensible (provenant des membranes 15B donneuses) pourrait alors être traitée par le NAGT-I (présent dans les membranes cellulaires de type sauvage « accepteur ») et devenir par suite Endo-H résistante; si des vésicules portant la protéine Gs bourgeonnaient de membranes de RE donneuses et fusionnaient avec les membranes golgiennes de l'homogénat accepteur, la Gs serait convertie en

Fig. 13. (a) La première reconstitution réussie de transport acellulaire. Tiré du cahier de laboratoire d'Erik Fries, 10 mai 1979. La bande pâle au-dessus de la bande principale du VSV dans la deuxième colonne à partir de la droite (flèche) provient de la maturation de la protéine G (dérivée des membranes donneuses) dans le compartiment accepteur du Golgi. (b) L'optimisation des conditions d'incubation a amélioré le rendement de la bande endo-H résistante significative, dans le travail publié. Panneau de gauche : les cellules 15B infectées ont été marquées par la méthionine S35 pendant 5 min, puis incubées dans le milieu avec de la méthionine non marquée pendant 0, 5, 10 ou 20 min et homogénéisées. Les extraits ont été appliqués directement sur le gel. Notez que dans les cellules 15B, la protéine G mature a un poids moléculaire apparent un peu plus petit que celui de la protéine G immature. Panneau de droite : les cellules 15B infectées par le VSV ont été marquées et la radioactivité a été chassée, de la même manière que pour les échantillons du panneau de gauche. Les cellules ont été homogénéisées et la fraction contenant le Golgi a été incubée avec la fraction contenant le Golgi de cellules non infectées, non marquées, de cellules sauvages pendant 0, 20 ou 40 min, puis traitées par l'endo-H. Notez qu'après 5 min de chasse *in vivo* et 20 min d'incubation *in vitro*, la protéine G endo-H résistante est détectée. L, N, NS et M sont des protéines de VSV non sécrétées. Adapté de Fries & Rothman (1981).

Gr. Pour qu'un signal soit authentique dans cette réaction acellulaire modifiée, il faut évidemment que des relations de proximité ne soient pas essentielles au transport dans la cellule, puisque le transport aurait lieu entre des organites dérivés de cellules distinctes. Par conséquent l'existence d'un signal devait suggérer qu'une spécificité chimique inhérente était la base du tri, plutôt que l'anatomie intracellulaire.

Avec ce nouveau dispositif de « test de complémentation », nous avons enfin trouvé les conditions de marquage *in vitro* qui permettrait la modification acellulaire à la même vitesse et avec à peu près la même efficacité que le transport dans la cellule. Comme dans la cellule, le transport acellulaire couplé à la glycosylation dépend de l'ATP et a lieu entre des compartiments fermés limités par des membranes, ce qui est démontré par la résistance à une attaque protéolytique de la portion du pic orienté vers la lumière de la protéine G (Fries & Rothman, 1980). Les premières conditions de marquage *in vivo* réussies comportaient un marquage court à la méthionine S35 suivi de 20 min de chasse à la méthionine non marquée en présence d'un découpleur protonique, qui arrête le transport en inhibant la synthèse de l'ATP

mitochondrial (figure 13a). James Jamieson et George Palade avaient en effet trouvé en 1968 que l'ATP (ou un autre NTP) est indispensable au transport, en utilisant un protocole analogue pour bloquer la sortie du RE au site de ses « éléments de transition », des régions spécialisées où des vésicules semblent être émises par le Golgi. Sur cet arrière-plan, l'hypothèse de travail la plus simple voulait que nous ayons reconstitué le transport des éléments transitionnels (des cellules B15) vers le Golgi (des cellules sauvages). Toutefois, nous admettions aussi qu'il n'était pas établi avec certitude que le RE était le compartiment donneur, celui-ci pouvant être un compartiment plus tardif (Fries & Rothman, 1980).

Et en effet, cela se révéla le cas. Nous avons trouvé plus tard (Fries & Rothman, 1981) que le transport pouvait être reconstitué sans éliminer l'ATP, simplement en allongeant la période de chasse *in vivo* assez longtemps (5 à 10 mn) pour permettre à la protéine G marquée à la méthionine S35 d'atteindre le Golgi des cellules 15B avant l'homogénéisation. Cela voulait dire que le Golgi, et non pas le RE ou ses éléments de transition, est le donneur. Puisque l'accepteur est également une membrane golgienne, il s'ensuivait que

le transport entre deux éléments golgiens, l'un issu des cellules B15 et l'autre des cellules sauvages, avait été reconstitué.

C'était surprenant, parce qu'il était admis dans les manuels que les citernes golgiennes s'écoulent du côté « immature » ou « en formation » (aujourd'hui désigné « *cis* ») vers le côté « mature » (aujourd'hui désigné « *trans* »). Cette interprétation était fondée sur des observations anatomiques plutôt que sur des constats fonctionnels. (Maintenant, c'est à dire trois décennies plus tard, il est de plus en plus clair que le transport au travers de l'appareil de Golgi résulte en fait principalement du transport de vésicules, bien que certains préfèrent encore les modèles de flux cisternaux). L'interprétation la plus simple de nos données était que le transfert entre les compartiments du Golgi peut se faire par les vésicules, et que nous avions reconstitué ce processus. Malheureusement, cela nous a mis dans la position inconfortable d'avoir reconstitué un processus dont on ne connaissait pas l'existence, double péché originel, qui a demandé un bon nombre d'années avant que la signification de ces résultats soit acceptée, jusqu'à ce que nous trouvions que *NSF*, l'un des gènes de sécrétion de levure isolés par Randy Schekman (Novick *et al.*, 1980), codait la protéine nécessaire à la fusion des vésicules dans les extraits acellulaires (Wilson *et al.*, 1989).

Nous avions cependant de fortes raisons de d'imaginer que la fusion membranaire spécifique était importante pour le signal dans le test. Comme on le voit dans la figure 13B, la résistance Endo H était observée dans les échantillons marqués par un *pulse* de 5 min suivi par une chasse *in vivo* avant homogénéisation et incubation en présence de membranes acceptrices. À ce moment-là, on savait donc que la protéine G du VSV marquée est en majeure partie localisée dans le Golgi. Toutefois, la protéine G EndoH résistante n'est pas produite *in vitro* quand les cellules sont broyées immédiatement après le marquage (sans chasse) ; à cet instant, la protéine G marquée du VSV est encore dans le RE. Avec des temps de chasse plus longs, la protéine G disparaît progressivement du Golgi donneur, au fur et à mesure qu'elle est transférée à la membrane plasmique avant l'homogénéisation cellulaire, et en conséquence le transport acellulaire s'atténue. Une réévaluation de nos premières expériences a confirmé que, bien que la production d'énergie ait été asphyxiée, elle n'a pas cessé instantanément, et que le transport a continué pendant les plusieurs minutes nécessaires à la cellule pour utiliser tout l'ATP présent. La période a été assez longue pour permettre à la majeure partie de la protéine G d'entrer dans le Golgi ; les deux expériences sont donc conciliables (il s'avère maintenant que le transport demande seulement environ 10 μ M d'ATP alors que les cellules maintiennent en général l'ATP dans une gamme millimolaire basse, si

bien que le transport peut continuer jusqu'à ce que la cellule ait utilisé la plus grande partie de son ATP).

La dépendance étroite entre l'efficacité du transport acellulaire et la présence de protéine G de VSV dans le Golgi plutôt que dans d'autres membranes cellulaires nous a convaincus qu'il s'agissait d'une vraie reconstitution, et non du résultat d'une fusion de membranes non spécifique. Une analyse plus détaillée (Balch *et al.*, 1984a, 1984b ; Braell *et al.*, 1984) a rapidement confirmé cette interprétation et apporté des améliorations clés. L'ajout d'UDP-[³H]GlcNAc (donneur de GlcNAc pour la glycosylation par NAGT-I) marque chaque protéine G transportée d'une quantité fixe de radioactivité, lorsque la molécule arrive dans le Golgi accepteur. Le transport est simplement mesuré par le niveau de protéine [³H]G produite. Cet apport, fait avec William Balch, alors post-doctorant (Balch *et al.*, 1984a), a massivement amélioré le rapport signal/bruit de fond et la portée dynamique du test et a permis de mesurer précisément les taux initiaux. Le test s'est donc transformé en un tremplin grâce auquel l'enzymologie a pu guider la purification et découvrir les composants indispensables.

Avec ³H comme indicateur de la protéine G transportée, nous avons pu utiliser l'autoradiographie sur des coupes ultrafines et des micrographies électroniques pour localiser le site accepteur de la protéine marquée (figure 14a). Cette analyse, réalisée par le post-doc William Braell (Braell *et al.*, 1984) a confirmé que la protéine G glycosylée réside dans les saccules golgiens, morphologiquement intacts, dérivés de l'homogénat accepteur. Ainsi, les saccules d'origine « donneur » et « accepteur » demeurent deux populations distinctes non altérées (figure 14b), suggérant fortement que la protéine G est transférée entre ces populations par des vésicules. Nous avons ensuite découvert en microscopie électronique que des vésicules de 70 à 90 nm de diamètre contenant des protéines G se formaient au niveau des saccules donneurs (figure 14c) (Balch *et al.*, 1984b). Un travail ultérieur avec Lelio Orci, de l'Université de Genève, a directement démontré que ces vésicules (maintenant appelées *COP1-coated vesicles*) contiennent de la protéine G de VSV et sont capturées par les saccules accepteurs, créant ainsi un équilibre entre les deux populations (Orci *et al.*, 1989).

Principe de base du bourgeonnement des vésicules

Ayant reconstitué pour la première fois ce processus, nous pouvions appliquer les méthodes de l'enzymologie pour identifier les protéines responsables et percer à jour leur mécanisme d'action. Cela exigeait la capacité de visualiser les intermédiaires du

Fig. 14. (a) Micrographie électronique montrant que la protéine qui contient ^3H -GlcNAc est associée aux saccules golgiens. La fraction qui contient le Golgi de cellules 15B infectées par le VSV a été incubée avec la fraction contenant le Golgi de cellules sauvages après incorporation d'UDP- ^3H -GlcNAc. L'ensemble a été préparé pour la radio-autographie électronique (Adapté de Braell *et al.*, 1984). (b) Les saccules d'origine « donneur » et « accepteur » demeurent deux populations distinctes non altérées. (c) En microscopie électronique, des vésicules de 70 à 90 nm de diamètre contenant des protéines G se forment au niveau des saccules donneurs.

bourgeonnement pour pouvoir établir le site d'action des protéines responsables.

Par bonheur, le grand microscopiste électronique Lelio Orci, qui venait de lire nos trois articles publiés à la suite dans *Cell* (décembre 1984), me téléphona pendant les vacances de Noël. Alors commença une collaboration qui devait se révéler exceptionnellement productive et prolongée, et qui devait mettre à profit l'immunocytochimie ultrastructurale pour décrire la nature et la composition des intermédiaires du transport. Très vite, nous avons confirmé avec un étudiant prédoctorant, Benjamin Glick, que les vésicules de transport bourgeonnantes contiennent de la protéine de VSV dans leurs membranes et que leur surface cytoplasmique est revêtue d'un manteau distinct du manteau à clathrine déjà identifié à cette époque (Orci *et al.*, 1986).

L'étape essentielle dans l'élucidation du mécanisme de bourgeonnement est issue de ma

découverte (réalisée pendant un bref séjour sabbatique dans le laboratoire de William Balch, alors à Yale) que le transport était inhibé par un analogue non hydrolysable de l'ATP, le GTP γ S (figure 16). Lelio, moi-même et un postdoc, Paul Mélançon, avons trouvé alors que le GTP γ S bloque le « déshabillage » (Mélançon *et al.*, 1987), si bien que les vésicules de transport « revêtues de COP » – comme nous les appelions alors – maintenant renommées COPI, pour faire place plus tard aux vésicules COPII de Randy Schekman (Barlowe *et al.*, 1994) – s'accumulent en masse, ce qui a permis leur purification (figure 17) par Vivek Malhotra et Tito Serafini (Malhotra *et al.*, 1989). L'isolement des vésicules amena deux découvertes centrales : celle des sous-unités « *coatomer* » qui s'assemblent à 7 pour constituer le manteau (Waters *et al.*, 1991); et que la petite GTPase facteur d'ADPribosylation (ARF) est en quantités stoechiométriques avec le *coatomer*, expliquant l'effet

Dissecting the Pathway by Combining Enzymology with Microscopy (1985-1993)

Fig. 15. Mon collaborateur au long cours et ami Lelio Orci, le maître moderne de la morphologie. Ensemble, nous avons combiné, entre 1985 et 1993, la morphologie et l'enzymologie sur le système acellulaire pour disséquer le cycle du transport vésiculaire. Nous avons ainsi découvert les vésicules couvertes de COPI et le mécanisme de commutation de la GTPase qui gouverne le bourgeonnement des vésicules de transport et la perte de leur enveloppe pour la fusion. Au-dessous, nos chiens bien-aimés, malicieusement baptisés pendant cette période pour évoquer l'interface entre la biochimie (mon chien, « Tampon ») et la morphologie (le sien, « Golgi ») !

Incubation	$[^3\text{H}]$ GlcNAc Incorporated into VSV-G Protein
Complete	3500 cpm
- ATP	50
- Cytosol	75
- Golgi membranes	95
+ GTP γ S (10 μM)	420
NEM-membranes	225

Fig. 16. Les conditions du transport acellulaire de la protéine G du VSV entre les saccules golgiens, détectés dans un test simple mis au point avec Bill Balch (Balch *et al.*, 1984). Au cours de travaux ultérieurs, avec Lelio Orci, nous avons trouvé deux inhibiteurs spécifiques du transport (GTP γ S et NEM) qui accumulent des intermédiaires du transport vésiculaire à des stades distincts de la maturation.

mystérieux du GTP γ S. Cette dernière observation montrait aussi le chemin vers le principe de base sous-tendant le mécanisme du bourgeonnement (Serafini *et al.*, 1991; Ostermann *et al.*, 1993; Tanigawa *et al.*, 1993) : ARF lié au GTP recrute le *coatomer* au Golgi (déclenchant l'assemblage du manteau et le bourgeonnement) et le relâche vers le cytosol après avoir hydrolysé le GTP (« *uncoating* »).

Dès 1993, la validité de ce modèle simple et intuitif fut confirmée à l'aide de protéines pures (Orci

Fig. 17. L'inhibition du transport par le GTP γ S provoque l'accumulation des vésicules de transport intermédiaires de 70 nm entourées d'un manteau protéique (à l'origine appelées vésicules revêtues de COP et maintenant appelées COPI) contenant la protéine G du VSV transportée. Une fraction pure de vésicules COPI a pu être produite en incubation acellulaire de membranes golgiennes (Malhotra *et al.*, 1989), grâce au blocage du « déshabillage » par des analogues non hydrolysables du GTP. Ce développement crucial a permis la découverte des sous-unités de la protéine (coatomes) et du rôle de la commutation par la GTPase de la protéine ARF dans le déclenchement de l'assemblage/désassemblage séquentiels du manteau (figure 18).

et al., 1993). ARF se charge de GTP à la surface du Golgi, et « commute » le bourgeonnement en recrutant le *coatomer* dans le cytosol. Le *coatomer*, maintenant concentré localement et orienté vers la surface de la membrane, s'auto-assemble par polymérisation dans le manteau, en incluant ARF[GTP]. Le manteau en s'étendant agit comme un outil mécanique pour sculpter la membrane appliquée en forme de vésicule dont la taille est déterminée par le diamètre interne du manteau. Le manteau forme alors un exosquelette qui doit être éliminé pour permettre à la vésicule enclose de fusionner, ce qui se produit lorsqu'ARF hydrolyse le GTP (figure 18).

Le même principe s'applique aux vésicules à clathrine (Stamnes *et al.*, 1993) et aux vésicules à COPII qui bourgeonnent du RE, comme l'ont montré Orci et Schekman (Barlowe *et al.*, 1994). La molécule particulière de la famille des ARF-GTPases utilisée et la nature du *coatomer* varient, permettant une diversité de régulation physiologique (par échange/hydrolyse de GTP) et une sélection de la charge (en liant des sous-unités du manteau). Mais dans tous les cas, des cycles de liaison de GTP et une hydrolyse subséquente promeuvent des cycles unidirectionnels (vectoriaux)

Fig. 18. Le mécanisme de commutation du GTP dans le bourgeonnement séquentiel et la perte du manteau des vésicules de transport pour la fusion membranaire. (Rothman, Orci et collaborateurs, 1991–1993). Voir le texte pour les détails.

de bourgeonnement de vésicules et de déshabillage (perte de leur enveloppe) pour la fusion des membranes.

Les protéines cytosoliques apportent de l'énergie à la fusion membranaire

L'identification des premières protéines nécessaires à la fusion membranaire s'enracine directement dans la reconstitution acellulaire du transport protéique. Cet aspect de l'histoire commence en 1987 avec la découverte par mon étudiant post-gradué Benjamin Glick (Glick *et al.*, 1987) que le transport acellulaire est bloqué (figure 16) par des concentrations faibles du réactif sulfhydryle-alkylant, N-éthylmaléimide (NEM). Félix Wieland (de Regensburg, alors en séjour sabbatique) et un post-doctorant, Mark Block, purifièrent le facteur N-éthylmaléimide-sensible (NSF) à partir du cytosol de cellules CHO, grâce à sa capacité à restaurer le transport après inactivation par le NEM (Block *et al.*, 1988). La microscopie électronique et d'autres techniques révélèrent que NSF est requis pour la fusion, puisque les vésicules s'accumulent après inhibition par le NEM (figure 19; Malhotra *et al.*, 1988). Nous avons vite compris que NSF est une ATPase et que l'hydrolyse de l'ATP et NSF sont nécessaires à la fusion des vésicules dans beaucoup de compartiments cellulaires, une nécessité extrêmement conservée dans l'évolution. Comme on l'a vu plus haut, notre identification de NSF comme l'équivalent animal du gène *Sec18* de la levure de Schekman fut centrale, parce qu'elle confirma la signification physiologique des résultats expérimentaux obtenus dans le système acellulaire et fit envisager l'universalité du mécanisme de fusion (Wilson *et al.*, 1989).

NSF étant une protéine cytoplasmique soluble, il doit se lier aux membranes pour intervenir dans le

Fig. 19. L'inhibition par le NEM conduit à l'accumulation des vésicules nues de 70nm de diamètre, contenant la protéine G de VSV, qui ne peuvent fusionner. (Adapté de Malhotra *et al.*, 1988).

processus de fusion. Le mécanisme fut clarifié avec l'identification de la protéine d'attachement du NSF soluble (*Soluble NSF Attachment Protein*, SNAP) qui fut purifiée grâce à sa capacité de lier le NSF aux membranes golgiennes (schématisé dans la figure 20) par mon étudiant post-gradué Douglas Clary (Clary *et al.*, 1990).

La découverte du complexe SNARE

Comment SNAP – elle aussi une protéine cytosolique – se lie-t-elle aux membranes? SNAP se lie à un ou plusieurs SNAP REcepteurs saturables à haute affinité (que nous avons appelé SNARE) présents sur les membranes golgiennes avant sa liaison à la forme liée à l'ATP du NSF. Ce complexe NSF/SNAP/SNARE

Fig. 20. Cycle d'assemblage/désassemblage de particules 20S. NSF, les SNAP et les SNARE forment des complexes hétéro-oligomères, alors appelés particules 20S. L'hydrolyse de l'ATP par NSF dissocie les particules 20S, régénérant ainsi les composants individuels pour un nouveau cycle de fusion membranaire.

sédimente comme une particule 20S après avoir été extrait des membranes à l'aide d'un détergent doux. Quand NSF hydrolyse l'ATP, il se libère du complexe (Wilson *et al.*, 1992).

Il paraissait vraisemblable que les SNARE seraient insérées directement dans les membranes parce que les récepteurs de SNAP gardent la capacité de lier SNAP, même après extraction des membranes à l'aide d'un traitement alcalin fort, dont la brutalité enlève tout ce qui n'est pas protéines membranaires intégrales (Weidman *et al.*, 1989). La purification des protéines de membrane devint notre priorité absolue, car nous supposions que la fusion des bicouches lipidiques nécessiterait des protéines ancrées à la membrane. Les protéines SNARE devinrent alors nos candidates prioritaires comme protéines de fusion.

À ce point critique en 1991, Thomas Söllner se joignit à moi (figure 21, à droite). C'était un chercheur doué, juste arrivé à Sloan Kettering à New York, où je venais d'emménager pour fonder le département de Biochimie et Biophysique.

Thomas venait d'achever un travail fondateur de base où il identifia les protéines clés de la membrane mitochondriale externe requises pour l'importation des protéines, lors de son doctorat en biochimie chez Walter Neupert à Munich. C'était là un nouvel événement opportun, qui ouvrit une collaboration très productive d'une décennie pendant laquelle nous proposerions et testerions les principes de l'hypothèse SNARE.

La signification du cycle, futile en apparence, de la fusion membranaire et de la libération du NSF entraînée par l'ATP, n'était pas claire au moment où Söllner rejoignit le laboratoire Rothman. Nous avons

imaginé que l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP poussait d'une manière ou d'une autre les SNARE ancrées dans la membrane à déclencher la fusion. Cependant l'existence du cycle liaison-libération eut un impact énorme sur notre stratégie d'identification des SNARE. L'assemblage et le désassemblage des particules 20S, qui impliquaient respectivement la liaison et la libération NSF/SNAP, pouvaient être exploités comme des étapes de purification par affinités séquentielles pour isoler les SNARE (figure 21 à gauche). Des expériences antérieures avaient montré que les méthodes chromatographiques standard et une étape unique d'affinité étaient incapables d'isoler les SNARE; le cycle ATPase 20S ajouterait un second niveau de spécificité biologique.

L'activité SNARE (c'est à dire la liaison par SNAP) pouvait être trouvée dans les fractions membranaires non purifiées d'homogénats de différentes lignées cellulaires et de tissus animaux, en dehors des membranes golgiennes purifiées dans lesquelles elle avait été détectée à l'origine. Il en ressortit que, parmi les tissus testés, les homogénats de cerveau, avaient l'activité spécifique SNARE la plus élevée et que des quantités importantes de SNARE pouvaient être obtenues facilement. Il s'agit bien sûr des critères classiques pour choisir une source de purification de protéines mais, dans notre cas, le choix du cerveau s'avérerait rapidement comme le plus favorable pour des raisons inattendues. La matière grise fut homogénéisée par centrifugation, puis un extrait protéique « soluble » fut préparé en traitant le résidu membranaire avec un détergent. L'extrait qui en résulta contenait l'activité SNARE ainsi que le plus gros des protéines de membrane intégrales maintenant « solubilisées », c'est à dire dispersées parmi les micelles du détergent.

Le système « assemblage » du cycle NSF fut alors utilisé à grande échelle comme la première de deux étapes biologiques spécifiques, schématisées dans la figure 20. L'idée était que les SNARE seraient séquestrées par rapport au gros des membranes protéiques par incorporation dans des complexes 20S formés avec des protéines NSF et SNAP bactériennes recombinantes purifiées, ajoutées de manière exogène. Cette incubation aurait lieu en présence d'ATP γ S (un analogue non hydrolysable de l'ATP) et en l'absence d'ions magnésium libres (Mg $^{++}$ est requis pour l'hydrolyse de l'ATP par NSF) pour promouvoir l'assemblage des particules 20S. Le NSF recombinant était exprimé à partir d'un épitope court de myc pour permettre aux particules 20S d'être isolées à l'aide d'un anticorps monoclonal (immobilisé sur des billes) dirigé contre cette étiquette myc.

La seconde étape biologiquement spécifique récapitulait le désassemblage des particules 20S. Comme on le voit dans la figure 21, à gauche, les

Purification of SNAP Receptor (SNARE) Proteins

Söllner *et al.* Nature, 1993

Fig. 21. Purification des protéines SNARE. À gauche, la SNAP recombinante et le NSF marqué par un épitope ont été assemblés en particules 20S avec des SNARE dérivées de fractions membranaires solubilisées au détergent en présence d'un analogue non hydrolysable de l'ATP, l'ATP γ S. Les particules 20S sont ensuite immobilisées sur des billes à l'aide d'un anticorps dirigé contre le NSF marqué par l'épitope, lavées en présence de MgATP γ S (« éluat non spécifique »), puis désassemblées en présence de MgATP, libérant les SNAP et les SNARE (« éluat spécifique »). Le NSF reste lié aux billes *via* l'anticorps. À droite, Thomas Söllner (vers 1993) qui m'a rejoint à Sloan-Kettering et avec qui j'ai découvert le complexe SNARE et ai eu pendant la décennie suivante une collaboration féconde au cours de laquelle l'hypothèse SNARE de la fusion membranaire spécifique a été démontrée. Thomas est maintenant Professeur de Biochimie à l'Université de Heidelberg. À ma grande joie, il a pu être présent au discours Nobel et j'ai pu le présenter à cette occasion.

SNARE seraient libérées, lors d'une incubation des billes avec des ions magnésium et de l'ATP, pour permettre au NSF d'hydrolyser l'ATP. Le NSF recombinant étiqueté myc resterait attaché aux billes par l'anticorps, tandis que les protéines SNAP recombinantes seraient libérées des membranes de cerveau, en même temps que les protéines liant SNAP.

Étant donné que la fusion de vésicules a lieu dans plusieurs compartiments membranaires, nous suspections que les cellules seraient dotées d'une grande famille de protéines SNARE, apparentées par leur séquence, mais localisées différemment. Nous fûmes donc surpris quand les SNARE obtenues à partir du cerveau entier donnèrent un échantillon remarquablement simple (montré dans la figure 22, à droite) comportant seulement quatre protéines, chacune présente dans l'éluat spécifique (MgATP) et absente de l'éluat non spécifique (MgATP γ S) (Söllner *et al.*, 1993a).

L'identité et la pureté de ces membranes protéiques furent établies par microséquençage et spectrométrie de masse des peptides dérivés de la toute petite quantité de matériel que nous avons isolée, grâce à l'expertise en chimie des protéines de Paul Tempst à Sloan-Kettering.

De manière étonnante, les quatre SNARE se révélèrent être des protéines de la synapse (figure 22, à droite). Elles avaient toutes déjà été clonées et séquencées, mais leur fonction était encore inconnue. Deux d'entre elles sont des isoformes de la syntaxine, une protéine de membrane plasmique identifiée

Söllner *et al.* Nature, 1993

Fig. 22. Le complexe SNARE, connu à l'époque de sa découverte comme la particule d'ancrage et de fusion. À droite, l'éluat MgATP spécifique a été analysé en électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les protéines ont été révélées par le bleu de Coomassie, puis identifiées par séquençage des aminoacides et spectroscopie de masse. Les bandes en haut du gel ont également été observées dans l'éluat non spécifique. À gauche notre interprétation d'après laquelle un complexe de protéines SNARE lie la vésicule synaptique à la membrane plasmique, y ancre fermement la vésicule et initie la fusion.

indépendamment par Richard Scheller (Bennett *et al.*, 1992) et Kimio Akagawa (Inoue *et al.*, 1992). La troisième est SNAP25, abrégé pour *Synaptosome-Associated-Protein of 25 kDa*, clonée par Michael

Wilson (Oyler *et al.*, 1989). SNAP25 réside principalement dans la membrane plasmique et fut identifiée à l'origine grâce à son abondance dans les synapses. Sa relation à la syntaxine et à la fusion membranaire fut une surprise, de même que la relation accidentelle de son acronyme à celui de la protéine d'attachement soluble de la NSF, SNAP.

VAMP/Synaptobrevin-2 fut la dernière protéine SNARE à émerger. Elle avait été clonée indépendamment par Pietro DeCamilli et Reinhard Jahn d'une part et par Scheller d'autre part (Baumert *et al.*, 1989; Elferink *et al.*, 1989). En contraste avec SNAP-25 et la syntaxine, VAMP réside principalement dans les vésicules synaptiques.

La découverte de VAMP dans le complexe fut l'observation clé, parce qu'elle suggéra immédiatement comment le complexe de protéines SNARE (peut être avec NSF ET SNAP) pouvait être important pour les fusions de membrane. Puisque VAMP dépasse de la membrane vésiculaire dans le cytosol, et que la syntaxine et SNAP-25 font de même hors de la membrane plasmique, un complexe impliquant les trois protéines intégrales pouvait rapprocher la vésicule de la membrane plasmique, plaçant leurs bicouches lipidiques à distance de contact moléculaire (figure 22, à gauche).

L'hypothèse SNARE et le principe de base de la fusion membranaire

Au lieu de nous restreindre au point de vue particulier de l'exocytose vésiculaire synaptique, nous avons décidé d'interpréter le complexe SNARE plus spéculativement en adoptant une perspective très large (Söllner *et al.*, 1993a). Les principes de base exigent de marquer d'une manière ou d'une autre les vésicules et leurs cibles pour détecter quelles vésicules fusionnent et où. Cela exige en retour que les marqueurs de vésicules et de cibles soient appariés. Nous avons suggéré que le mécanisme d'appariement le plus simple soit un assemblage automatique, dans lequel seules les paires appariées de vésicules (v) et de cibles (t, pour *target*) parentes se lient par leurs membranes, formant ainsi le complexe « v-t » prérequis pour la fusion.

Nous basant sur ce concept, nous avons proposé « l'hypothèse SNARE », dans laquelle les SNARE sont les marqueurs de vésicule et de cible, que nous avons appelés v-SNARE et t-SNARE (figure 23). VAMP est le v-SNARE de la vésicule synaptique; la syntaxine et SNAP-25 sont les sous-unités du t-SNARE parent dans la membrane plasmique. L'hypothèse SNARE donne le cadre qui permet de généraliser nos résultats. Nous avons suggéré que chaque type de vésicule dans la cellule aurait son propre v-SNARE, homologue de VAMP, et que chaque membrane cible serait marquée

The SNARE Hypothesis for Delivery at the Right Place and the Right Time

Söllner *et al.*,
Nature, 1993

Fig. 23. L'hypothèse SNARE proposée au début, expliquée dans le texte.

par un t-SNARE, dont les sous-unités seraient homologues de la syntaxine et SNAP-25. De plus, nous avons suggéré que « Dans l'interprétation la plus simple, c'est à dire en l'absence d'une autre source de spécificité, un événement de fusion abouti ne s'engagerait que si des paires complémentaires v-SNARE/t-SNARE se formaient » (Söllner *et al.*, 1993a).

En accord avec ce modèle simple, VAMP et la syntaxine sont des protéines ayant un domaine cytoplasmique et un transmembranaire, alors que SNAP25 est ancrée à la face interne de la membrane plasmique par des acides gras covalents. Des quantités quasiment équimolaires de VAMP, de syntaxine (les deux isoformes étant considérées ensemble) et de SNAP-25 ont été trouvées dans les complexes isolés. De plus, les protéines SNARE ont été isolées parce qu'elles se lient à et forment avec NSF et SNAP une particule 20S. NSF et SNAP sont connues pour œuvrer à la fusion, ce qui veut dire que les SNARE le font aussi. Le complexe SNARE a progressé de la première étape de sa découverte jusqu'à la publication finale d'un seul coup, de seulement cinq semaines étourdissantes.

Au moment de cette expérience, la fusion membranaire semblait complexe et brumeuse parce qu'un cadre conceptuel manquait pour organiser la liste croissante de gènes et de séquences. Un grand nombre de gènes et de protéines de levure et de cellules animales, y compris les neurones, étaient impliqués et semblaient participer d'une manière ou d'une autre au processus général du transport, ou de la fusion des vésicules et de leur régulation. On se rendit compte tout de suite que beaucoup de ces gènes et protéines appartenaient à des familles conservées par l'évolution

qui affectent différentes étapes du transport (revue dans Bennett & Scheller, 1993). Une douzaine de protéines ou plus résidaient dans la vésicule synaptique seule, on le savait. Mais il fallait deviner quelles protéines pouvaient catalyser la fusion ou pourvoir la spécificité, en distinguant celles qui affectent la fusion indirectement au niveau de la régulation cellulaire et beaucoup de protéines avaient été proposées comme candidates pour la fusion, y compris synaptophysine, synaptoporine et SV2. Notamment, VAMP et syntaxine, bien que considérées comme importantes, n'étaient pas en vedette dans ce contexte; on ne suggérait pas qu'elles puissent former un complexe et SNAP-25 n'était pas mise en rapport avec l'exocytose.

L'impact originel de notre article venait de la combinaison d'une découverte inattendue – le complexe SNARE – et d'un vaste concept clairement énoncé – l'hypothèse SNARE – qui en était déduit. L'impact en a été amplifié parce que la découverte du complexe SNARE liait étroitement trois domaines : la biologie cellulaire (transport vésiculaire), la physiologie (sécrétion endocrine et exocrine) et la neurobiologie (transmission synaptique); trois disciplines (biochimie acellulaire, génétique de la levure et électrophysiologie); ainsi que beaucoup de cellules et d'organismes à la mode. Notre papier changea donc le point de mire de la biologie cellulaire, le déplaçant des particularités physiologiques et des variations de régulation vers une machinerie centrale et des mécanismes universels.

Dans le travail qui s'ensuivit, nous avons trouvé que NSF et SNAP ont pour effet de dissocier le complexe SNARE avec l'énergie dérivée de l'hydrolyse de l'ATP (Söllner *et al.*, 1993b) et plus tard William Wickner montra que SNAP et NSF ne sont pas directement impliqués dans la fusion des bicouches (Mayer *et al.*, 1996). Cela focalisa l'attention sur la possibilité restante la plus simple, selon laquelle le complexe SNARE est seul indispensable pour produire la fusion. Toutefois, NSF et SNAP jouent un rôle critique en maintenant la fusion en cours. Ils séparent les v-SNARE des t-SNARE après la fusion (alors que celles-ci résident dans la même bicouche), mais pas pendant la fusion (quand ils sont appariés entre les bicouches) (Weber *et al.*, 2000). NSF et SNAP peuvent donc recycler les complexes SNARE après la fusion, tout en protégeant la fusion en cours.

Le complexe SNARE est extraordinairement stable, il résiste à la dénaturation jusqu'à 90 °C (Hayashi *et al.*, 1994). La structure en bâtonnets du complexe SNARE avec ses ancrages aux membranes à une extrémité implique qu'il pourrait amener deux membranes en contact étroit et que l'énergie de liaison de l'assemblage SNARE pourrait piloter la fusion des bicouches (Hanson *et al.*, 1997).

SNAREs – The Core Fusion Machinery

Fig. 24. Les v-SNARE (en vert) sur une vésicule se lient à leurs t-SNARE apparentées (en rouge) sur la membrane cible, formant des « *SNAREpins* » (« épingles SNARE ») spécifiques qui fusionnent alors les deux membranes. Pour la simplicité, la t-SNARE est montrée comme un bâtonnet allongé unique, bien que l'on sache maintenant qu'elle contribue par trois hélices α à la formation d'un faisceau v-t-SNARE à quatre hélices. D'autres protéines régulent l'assemblage et le désassemblage des « *SNAREpins* », contrôlant ainsi la fusion membranaire.

Un test direct de cette possibilité ne pourrait se faire qu'en évaluant cette fonction en l'absence de toute autre protéine. En reconstituant des SNARE de l'exocytose neuronale recombinantes dans des liposomes, on a établi que l'appariement de SNARE parentes entre des bicouches lipidiques réalise effectivement la fusion membranaire spontanée (Weber *et al.*, 1998) (figure 24). Ainsi, quand des paires de v-SNARE et t-SNARE complémentaires se forment, non seulement une fusion effective s'initie – comme nous l'avions imaginé d'abord – mais elle s'accomplit entièrement.

La possibilité d'observer la fusion de SNARE isolées a ouvert la porte à un test tout à fait direct de l'élément central de l'hypothèse SNARE : le fait que la spécificité de la fusion membranaire est codée par la chimie physique des protéines SNARE isolées (McNew *et al.*, 2000; Fukuda *et al.*, 2000; Parlati *et al.*, 2000, 2002; Paumet *et al.*, 2001). Au total, 275 combinaisons de v-SNARE et de t-SNARE codées dans le génome de la levure, représentant le RE, le Golgi, la membrane plasmique, les endosomes et les vacuoles (lysosomes), ont été testées du point de vue de la fusion. Parmi celles-ci, seules neuf combinaisons sont « fusogéniques » (environ 3%) et toutes sauf une (environ 0,4%) correspondent à des voies de transport (figure 25). À peu près sans exception, la fusion n'a lieu que dans les rares combinaisons de v- et t-SNARE tirées de compartiments reliés par des navettes de vésicules dans la cellule vivante. Autrement dit, un physico-chimiste, armé seulement de la séquence ADN

SNAREs Encode Compartmental Specificity

Fig. 25. La preuve que les SNARE codent pour la spécificité des compartiments a été obtenue à l'aide d'une expérience à grande échelle (2001–2002) dans laquelle la totalité des SNARE codées dans le génome de la levure a été testée pour son potentiel de fusion dans de nombreuses combinaisons sur des vésicules lipidiques reconstituées. Voir le texte pour les détails.

de la levure et de l'hypothèse SNARE, peut tester des SNARE isolées pour déterminer le potentiel de fusion et les voies de transport possibles dans la cellule avec une précision de 99,6 %.

Le mécanisme de la fusion des bicouches lipidiques par les *SNAREpins* (épingles SNARE)

Le mécanisme physicochimique de la fusion a été fortement suggéré par la structure cristalline aux rayons X du complexe SNARE, élucidée par Axel Brunger et Reinhard Jahn plus tard cette année-là (Sutton *et al.*, 1998). Un faisceau de quatre hélices alpha parallèles a été révélé, qui forme un arrangement en épingle, maintenant les deux bicouches ensemble pendant que la fermeture éclair du complexe SNARE réalise la fusion (figure 26). Nous avons désigné ces hélices « *SNAREpins* ». Très récemment, avec notre collègue de Yale Yongli Zhang, nous avons mesuré directement la force qui fusionne les bicouches sur des molécules isolées (figure 27) dans des expériences où le complexe SNARE est littéralement déchiré et ensuite autorisé à se refermer – la puissance de la fusion! – ce qu'il fait en deux étapes séparées (Gao *et al.*, 2012).

L'intermédiaire à moitié refermé offre une pause naturelle qui peut être stabilisée par la liaison à d'autres protéines, pour permettre la régulation de la fusion membranaire après l'arrimage des vésicules. Un exemple important est fourni par la protéine

complexine (McMahon *et al.*, 1995), identifiée par Thomas Südhof (en même temps que le senseur calcique synaptotagmine (Geppert *et al.*, 1994)) comme un régulateur clé de la libération de neurotransmetteur dans la transmission synaptique. Au cours d'une collaboration récente avec une collègue de Yale, Karin Reinisch (Kümmel *et al.*, 2011), nous avons trouvé que la complexine stabilise exactement l'état à moitié zippé (figure 28), ce qui explique comment les vésicules synaptiques peuvent être prêtes à libérer des neurotransmetteurs en moins d'1ms, beaucoup plus vite que le temps (50–100 ms) requis pour l'ensemble du processus de fusion par les SNARE isolées après l'arrimage initial par les *SNAREpins* (Karatekin *et al.*, 2010).

Avec mes collègues actuels au Département de Biologie Cellulaire de Yale (figure 29), j'espère essentiellement mieux comprendre comment les protéines SNARE sont régulées dans l'exocytose ainsi que les détails encore discutés de la dynamique du tri protéique dans l'appareil de Golgi.

Réflexions finales

Savoir comment les membranes sont transportées dans la cellule était un problème fondamental de la biologie qui semblait inaccessible il y a trois décennies.

Pourtant aujourd'hui nous comprenons les aspects principaux de ce processus vital au niveau physicochimique. Voilà un témoignage simple en faveur de la puissance de la méthode scientifique réductionniste, promue avec tant de perspicacité et de si bonne heure par Edward Buchner à l'aube de la biochimie moderne, il y a plus d'un siècle.

En rédigeant cette conférence, qui m'offre une opportunité rare de passer en revue des décennies de recherches personnelles, je constate de plus en plus nettement que mon travail a prospéré grâce à la culture scientifique (ou à l'écosystème). Comme Hans Krebs (Prix Nobel, 1953) l'écrivait : « *les scientifiques ne naissent pas, ils sont faits par ceux qui leur enseignent* » (Krebs, 1967). Dans cet article remarquable, Krebs explique ses origines scientifiques en termes d'une lignée de chimistes organiciens et biochimistes, dont chacune a formé la suivante, embrassant presque un siècle, une chaîne encore intacte, qui remonte jusqu'au chimiste des teintures von Bayer, virtuellement tous Prix Nobel (figure 30). Il y a beaucoup de lignages similaires dans d'autres domaines, tels que la génétique, la physiologie, la microbiologie, et la recherche médicale. Ces écosystèmes extraordinaires ont une composante temporelle majeure, qui les rend difficiles à établir et par conséquent précieux pour les rares sociétés qui les possèdent, non seulement pour le savoir et les technologies qu'ils génèrent mais

La fusion est thermodynamiquement couplée au repliement des protéines SNARE entre les membranes

L'accrochage des *SNAREpins* exerce une force (F) vers l'intérieur qui détermine la fusion

La force disparaît seulement après la fusion des bicouches

- Une seule *SNAREpin* suffit pour une fusion des bicouches, mais de multiples « épingles » sont nécessaires pour une fusion optimale
- L'énergie libérée par le repliement de la protéine SNARE est utilisée pour agir sur la bicouche lipidique
- Les SNARE sont ensuite recyclées par la NSF-ATPase qui les déplie.
- Les SNARE se replient en formant un faisceau de 4 hélices, très stable durant la fusion
- La fusion entraînée par les SNARE est rapide (10-100ms après l'ancrage), et spontanée entre la vésicule et la bicouche

Fig. 26. Résumé des connaissances actuelles sur le mécanisme de fusion. Adapté de Südhof & Rothman (2009).

Fig. 27. La structure modulaire du complexe SNARE. Lorsqu'elle est disséquée avec des pinces optiques, la moitié C-terminale (proche de la membrane) du faisceau de quatre hélices (CTD) s'ouvre et se referme en tout-ou-rien, expliquant un état intermédiaire à moitié fermé au cours de fusion dépendante des SNARE (D'après Gao *et al.*, 2012).

aussi pour les bénéfices économiques qu'ils apportent. Les écosystèmes scientifiques ne peuvent prospérer que dans les sociétés qui soutiennent la science à très long terme.

La perspicacité et les réalisations de ces prédécesseurs me rendent profondément humble. Comme Buchner l'a énoncé en son temps (figure 31),

nous partageons la conviction profonde, maintenant illustrée par les résultats de plus d'un siècle de découvertes, qu'il n'y pas de processus biologique qui ne soit de nature physico-chimique. En conséquence directe, nous pouvons nous attendre à ce que, éventuellement, la vie tout entière – même la pensée et les émotions humaines – sera expliquée comme une

Fig. 28. La complexine (hélices violettes) *trans*-clampe les *SNAREpins* à moitié zippées et synchronise ainsi la libération du neurotransmetteur, permettant la transmission synaptique rapide. L'hélice accessoire de la complexine s'étire à partir d'une des *SNAREpins* vers une autre où elle va s'insérer dans la portion proximale à la membrane (cercle rouge). Ici, l'hélice accessoire se lie aux t-SNARE (hélices vertes et jaunes) à l'endroit même où, sinon, la v-SNARE (bleu clair) se lierait pour compléter la fusion membranaire. Par conséquent, la complexine stabilise l'intermédiaire à moitié zippé visualisé grâce aux pinces optiques, qui autrement serait transitoire (figure 27). (D'après Kümmel *et al.*, 2011).

Fig. 29. Mon laboratoire et moi-même rassemblés sous la rotonde au-dessus de la bibliothèque historique de l'École de Médecine de Yale, le matin de l'annonce du Prix Nobel. Le Professeur Joy Hirsch, mon épouse, est à ma droite.

émanation de la physique et nous nous regarderons, dans la santé et la maladie, comme des machines organiques complexes. Cette perspective pourrait en effrayer certains, mais ne le devrait pas, car elle offre à notre espèce le meilleur espoir sur le long terme.

Fig. 30. Un écosystème long d'un siècle – de la biochimie des teintures à l'enzymologie à la biologie cellulaire moderne. La partie ombrée est reproduite à partir de H. Krebs, « *La construction d'un scientifique* », *Nature* (1967).

"We must never let ourselves fall into thinking "*ignorabimus*" ("We shall never know"), but must have every confidence that the day will dawn when even those processes of life which are still a puzzle today will cease to be inaccessible to us natural scientists." - E. Buchner

from the Nobel Lecture December 11, 1907

Fig. 31. La foi précoce de Büchner dans le réductionnisme s'est prouvée bien fondée et ses paroles sonnent toujours vraies aujourd'hui : « Nous ne devons jamais nous laisser aller à penser « *Ignorabimus* » (Nous ne saurons jamais), mais devons avoir confiance qu'un jour viendra où les processus de la vie encore mystérieux cesseront d'être inaccessibles à nous, scientifiques naturalistes ». E. Buchner, conférence Nobel, 11 décembre 1907.

Remerciements

Bien qu'elle soit souvent source de frustrations, la Science combine le plaisir et la découverte de manière égale (illustré satiriquement dans la figure 32). Je désire remercier mon écosystème personnel de m'avoir aidé à rendre ma vie en science à la fois productive et amusante. Cela inclut une énorme dette de gratitude envers les nombreux étudiants et chercheurs post-doctoraux qui ont contribué à cet ensemble de travaux depuis plus de trois décennies, et dont la plupart n'ont pas été mentionnés spécifiquement. Cela inclut également les grands exemples et les professeurs avec lesquels j'ai fait mon apprentissage, ainsi que les environnements merveilleux dans lesquels j'ai eu le privilège de travailler, plus particulièrement Stanford et

Fig. 32. Les bulles symbolisent les vésicules dans la cellule mais aussi le plaisir et la liberté de la science de bonne qualité. C'est pourquoi quand la photographe japonaise Kunié Sugiura m'a demandé de poser pour un de ses photographes uniques afin d'illustrer mon travail scientifique, j'ai choisi de souffler des bulles.

Sloan-Kettering sous la conduite de Paul Marks. Beaucoup d'amis proches, scientifiques et personnels, ont enrichi à long terme ma vie et mon travail; enfin plus spécialement ma femme, compagne spirituelle et partenaire intellectuelle, Joy Hirsch, et mes enfants, Lisa et Matthew.

En préparant la forme écrite de cette conférence Nobel, j'ai puisé largement dans mes propres paroles, déjà publiées à l'occasion de diverses récompenses et plus particulièrement du Prix Lasker et du Prix Kavli, ainsi que dans deux publications de la série des « Grandes Expériences », une publication de 2001 sur le Web, qui malheureusement n'est plus disponible. Finalement, une mention spéciale pour Willa Bellamy qui, pendant 22 ans et dans trois institutions académiques, a été mon assistante exécutive et qui prend sa retraite cette année.

Références

- Balch, W., Dunphy, W., Braell, W. and Rothman, J. (1984a) Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine. *Cell*, 39, 405-416.
- Balch, W., Glick, B. and Rothman, J. (1984b) Sequential intermediates in the pathway of intercompartmental transport in a cell-free system. *Cell*, 39, 525-536.
- Barlowe C., Orci L., Yeung T., Hosobuchi M., Hamamoto S., Salama N., Rexach M., Ravazzola M., Amherdt M., and Schekman R. (1994) COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell*, 77, 895-907.
- Baumert, M., Maycox, P. R., Navone, F., De Camilli, P., and Jahn, R. (1989) Synaptobrevin: an integral membrane protein of 18,000 daltons present in small synaptic vesicles of rat brain. *EMBO J*, 8, 379-84.
- Bennett, M., and Scheller, R. (1993) The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 2559-2563.
- Bennett, M., Calakos, N., and Scheller, R. (1992) Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science*, 257, 255-259.
- Block, M., Glick, B., Wilcox, C., Wieland, F. and Rothman, J. (1988) Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, 7852-7856.
- Braell, W., Balch, W., Dobberty, D., and Rothman, J. (1984) The glycoprotein that is transported between successive compartments of the Golgi in a cell-free system resides in stacks of cisternae. *Cell*, 39, 511-524.
- Clary, D., Griff, I. and Rothman, J. (1990) SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell*, 61, 709-721.
- Elferink, L., Trimble, W., and Scheller, R. (1989) Two vesicle-associated membrane protein genes are differentially expressed in the rat central nervous system. *J Biol Chem*, 264, 11061-11064.
- Fries, E. and Rothman, J. (1980) Transport of vesicular stomatitis virus glycoprotein in a cell-free extract. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77, 3870-3874.
- Fries, E. and Rothman, J. (1981) Transient activity of Golgi-like membranes as donors of vesicular stomatitis viral glycoprotein *in vitro*. *J Cell Biol*, 90, 697-704.
- Fukuda, R., McNew, J., Weber, T., Parlati, F., Engel, T., Nickel, W., Rothman, J., and Söllner, T. (2000) Functional architecture of an intracellular membrane t-SNARE. *Nature*, 407, 198-202.
- Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R., Li, C., Rosahl, T., Stevens, C., and Südhof, T. (1994) Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell*, 79, 717-27.
- Glick, B. and Rothman, J. (1987) A possible role for acyl-coenzyme A in intracellular protein transport. *Nature*, 326, 309-312.
- Gao, Y., Zorman, S., Gundersen, G., Xi, Z., Ma, L., Sirinakis, G., Rothman, J. and Zhang, Y. (2012) Single Reconstituted Neuronal SNARE Complexes Zipper in Three Distinct Stages. *Science*, 337, 1340-1343.
- Hanson, P., Roth, R., Morisaki, H., Jahn, R., and Heuser, J. (1997). Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell*, 90, 523-535.
- Hayashi, T., McMahon, H., Yamasaki, S., Binz, T., Hata, Y., Südhof, T. C., and Niemann, H. (1994). Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO J*, 13, 5051-5061.
- Inoue A., Obata K., Akagawa K. (1992) Cloning and sequence analysis of cDNA for a neuronal cell membrane antigen, HPC-1. *J Biol Chem*, 267, 10613-10619.

- Karatekin, E., Di Giovanni, J., Iborra, C., Coleman, J., O'Shaughnessy, B., Seagar, M., and Rothman, J. (2010) A fast, single-vesicle fusion assay mimics physiological SNARE requirements. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107, 3517-3521.
- Krebs, H. (1967) The Making of a Scientist. *Nature*, 215, 1441-1445.
- Kümmel, D., Krishnakumar, S., Radoff, D., Li, F., Giraudo, C., Pincet, F., Rothman, J., and Reinisch, K. (2011) Complexin Cross-links prefusion SNAREs into a Zig-Zag Array. *Nat Struct Mol Biol*, 18, 927-933.
- Malhotra, V., Orci, L., Glick, B., Block, M. & Rothman, J. (1988) Role of an N-ethylmaleimide-sensitive transport component in promoting fusion of transport vesicles with cisternae of the Golgi stack. *Cell*, 54, 221-227.
- Malhotra, V., Serafini, T., Orci, L., Shepherd, J., and Rothman, J. (1989) Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack. *Cell*, 58, 329-336.
- Mayer, A., Wickner, W., and Haas, A. (1996) Sec18p (NSF)-driven release of Sec17p (alpha-SNAP) can precede docking and fusion of yeast vacuoles. *Cell*, 85, 83-94.
- McMahon H., Missler, M., Li, C., Südhof, T. (1995) Complexins: cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function *Cell*, 83, 111-9.
- McNew, J., Parlati, F., Fukuda, R., Johnston, R., Paz, K., Paumet, F., Söllner T., and Rothman, J. (2000) Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature*, 407,153-159.
- Mélançon, P., Glick, B., Malhotra, V., Weidman, P., Serafini, T., Gleason, M., Orci, L., and Rothman, J. (1987) Involvement of GTPbinding "G" proteins in transport through the Golgi stack. *Cell*, 51, 1053-1062.
- Novick, P., Field, C., and Schekman, R. (1980) The identification of 23 complementation groups required for post-translocational events in the yeast secretory pathway. *Cell*, 21, 205-15.
- Orci, L., Glick, B. and Rothman, J. (1986) A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin: Its possible role in protein transport within the Golgi stack. *Cell*, 46, 171-184.
- Orci, L., Malhotra, V., Amherdt, M., Serafini, T., and Rothman, J. (1989) Dissection of a single round of vesicular transport: Sequential intermediates for inter-cisternal movement in the Golgi stack. *Cell*, 56, 357-368.
- Orci, L., Palmer, D., Amherdt, M., and Rothman J. (1993) Coated vesicle assembly in the Golgi requires only coatamer and ARF proteins from the cytosol. *Nature*, 364, 732-734.
- Ostermann, J., Orci, L., Tani, K., Amherdt, M., Ravazzola, M., Elazar, Z., and Rothman, J. (1993) Stepwise assembly of functionally active transport vesicles. *Cell*, 75, 1015-1025.
- Oyler, G., Higgins, G., Hart, R., Battenberg, E., Billingsley, M., Bloom, F., and Wilson, M. (1989) The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J Cell Biol*, 109, 3039-3052.
- Palade, G. (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*, 189, 347-58.
- Parlati, F., McNew, J., Fukuda, R., Miller, R., Söllner, T., and Rothman, J. (2000) Topological restriction of SNARE-dependent membrane fusion. *Nature*, 407, 194-198.
- Parlati, F., Varlamov, O., Paz, K., McNew, J., Hurtado, D., Söllner, T., and Rothman, J. (2002) Distinct SNARE complexes mediating membrane fusion in Golgi transport based on combinatorial specificity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 54424-54429.
- Paumet, F., Brügger, B., Parlati, F., McNew, J., Söllner, T., and Rothman, J. (2001) A t-SNARE of the endocytic pathway must be activated for fusion. *J Cell Biol*, 155, 961-968.
- Pearse, B. (1976) Clathrin: A unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc Nat Acad Sci USA*, 73, 1255-1259.
- Roth, T. and Porter, K. (1964) Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes Aegypti* L., *J Cell Biol*, 20, 313-332.
- Serafini, T., Orci, L., Amherdt, M., Brunner, M., Kahn, R., and Rothman, J. (1991) ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: A novel role for a GTP-binding protein. *Cell*, 67, 239-253.
- Söllner T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., and Rothman, J. (1993a) SNAP receptors implicated in vesicle targeting, and fusion. *Nature*, 362, 318-324.
- Söllner, T., Bennett, M., Whiteheart, S., Scheller, R., and Rothman, J. (1993b) A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*, 75, 409-418.
- Stamnes, M. and Rothman, J. (1993) The binding of AP-1 clathrin adaptor particles to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein. *Cell*, 73, 999-1005.
- Sutton, R., Fasshauer, D., Jahn, R. and Brunger, A. (1998) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*, 395, 347-353.
- Südhof, T. and Rothman, J. (2009) Membrane Fusion: Grappling with SNARE and SM Proteins. *Science*, 323, 474-477
- Tanigawa, G., Orci, L., Amherdt, M., Ravazzola, M., Helms, J., and Rothman, J. (1993) Hydrolysis of bound GTP by ARF protein triggers uncoating of Golgi-derived COP-coated vesicles. *J Cell Biol*, 123, 1365-1371.
- Waters, M., Serafini, T., and Rothman, J. (1991) "Coatamer": A cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature*, 349, 248-251.

- Weber, T., Zemelman, B., McNew, J., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Söllner T., and Rothman, J. (1998) SNAREpins: Minimal machinery for membrane fusion. *Cell*, 92, 759-772.
- Weber, T., Parlati, F., McNew, J., Johnston, R., Westermann, B., Söllner, T., and Rothman, J. (2000) SNAREpins are functionally resistant to disruption by NSF and alphaSNAP. *J Cell Biol*, 149, 1063-1072.
- Weidman, P., Mélançon, P., Block, M., and Rothman, J. (1989) Binding of an N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein to Golgi membranes requires both a soluble protein(s) and an integral membrane receptor. *J Cell Biol*, 108, 1589-1596.
- Wilson, D. W., Whiteheart, S. W., Wiedmann, M., Brunner, M., and Rothman, J. (1992). A multisubunit particle implicated in membrane fusion. *J Cell Biol*, 117, 531-538.