

TRAFIC VÉSICULAIRE INTRA-CELLULAIRE

Rôle de la voie endo/exo-cytaire (eucaryote)

- Modification des molécules qui seront sécrétées vers l'extérieur
- Connections (indirecte) de la membrane plasmique au réticulum endoplasmique
- maintien de l'asymétrie de la membrane
- pas de membrane à traverser pour les molécules solubles transportées(cargos)

Équilibre entre les compartiments

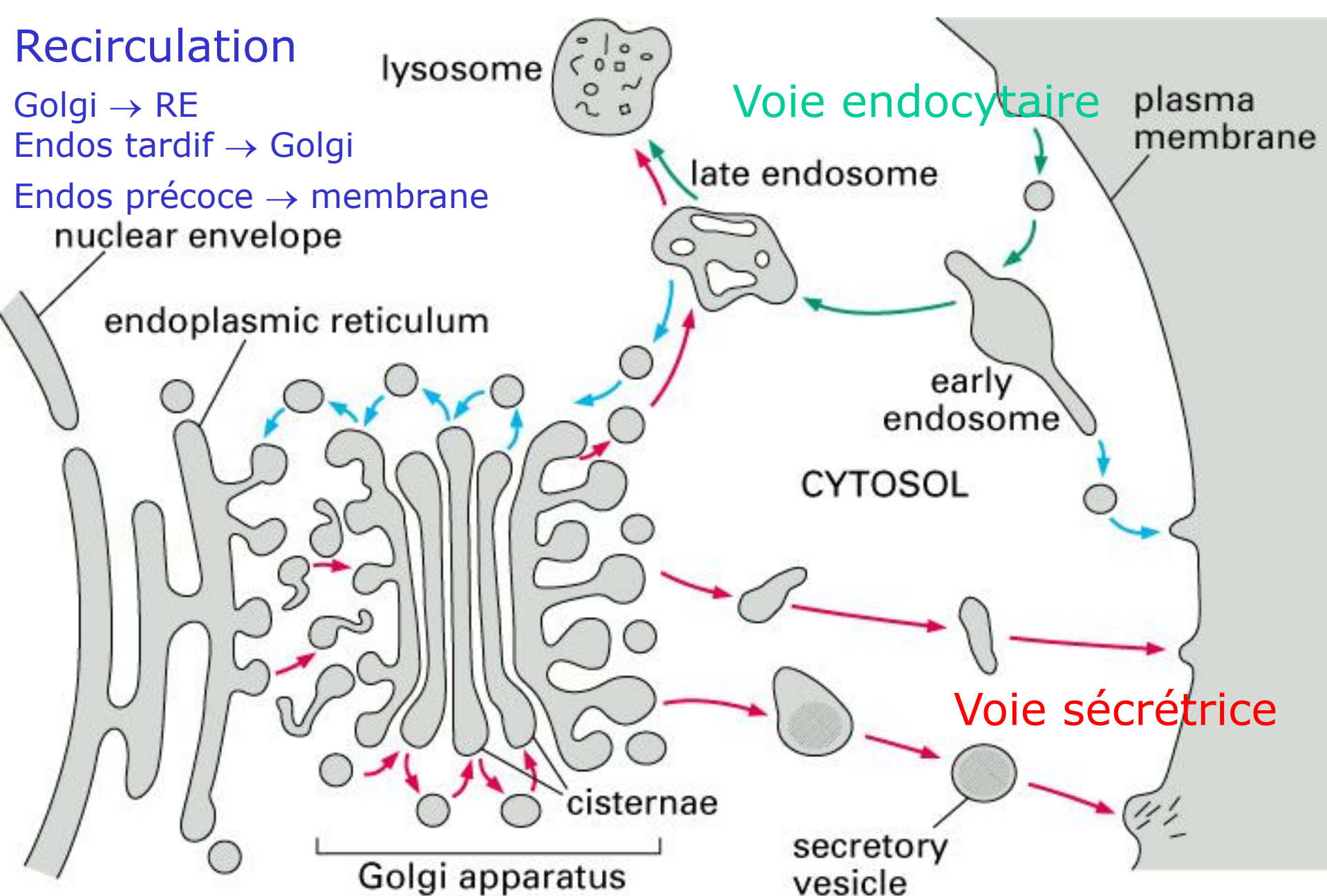
- L'exocytose et l'endocytose sont aussi des moyens d'équilibrer les surfaces membranaires
- Sélectivité
 - Des cargos transportés
 - Des destinations

Recirculation

Golgi → RE

Endos tardif → Golgi

Endos précoce → membrane
nuclear envelope



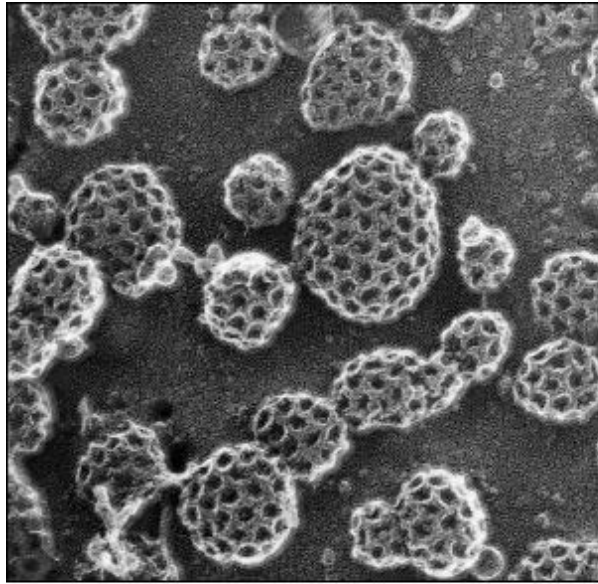
- Compartiments intracellulaires impliqués dans les voies endo/exo-cytaires

Les mécanismes moléculaires du trafic vésiculaire

Le trafic vésiculaire repose sur la formation de vésicules et leur fusion avec un compartiment donné.

1. - Comment sont formées les vésicules?
Comment sont sélectionnés les cargos transportés? Rôle du manteau et des GTPases d'assemblage
2. Comment sont dirigées les vésicules vers le compartiment receveur? Rôle des Rab GTPases dans l'amarrage
3. Comment fusionnent les membranes vésiculaires et du compartiment cible? Rôle des SNARES dans la fusion membranaire

Les deux rôles du manteau

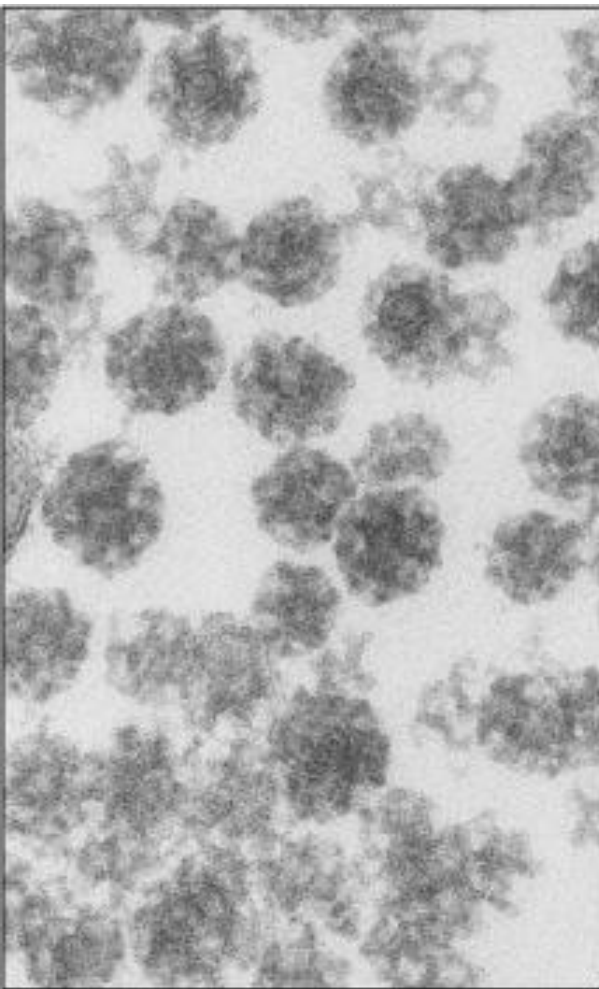


0.2 μm

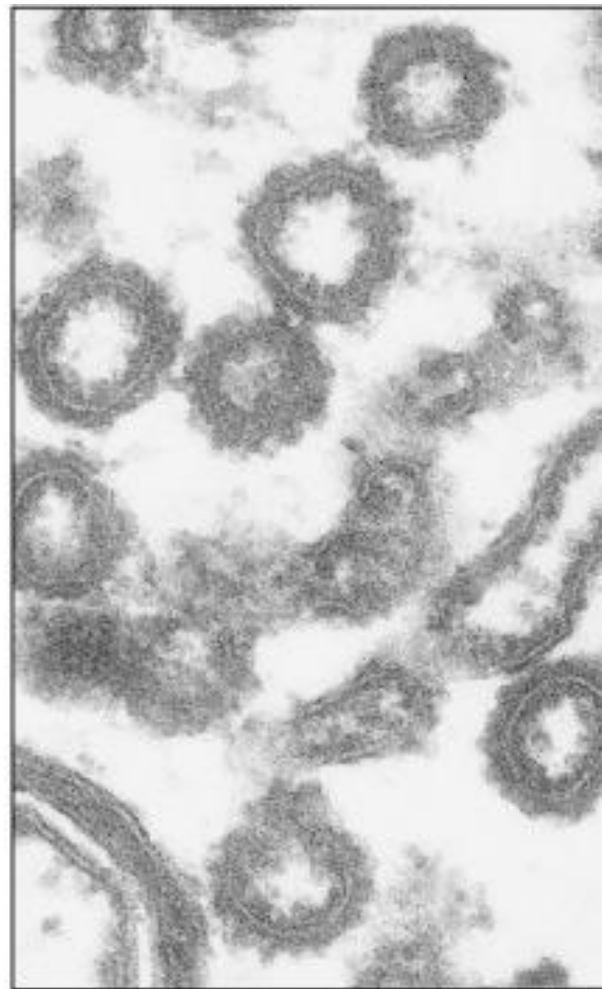
*Puits et vésicules recouverts de clathrine
en congélation sublimation rapide*

- Concentration de protéines membranaires dans un patch qui formera la vésicule → permet la sélection des molécules à transporter
- Moule la vésicule, permet la courbure de la membrane et l'individualisation d'une portion de mb

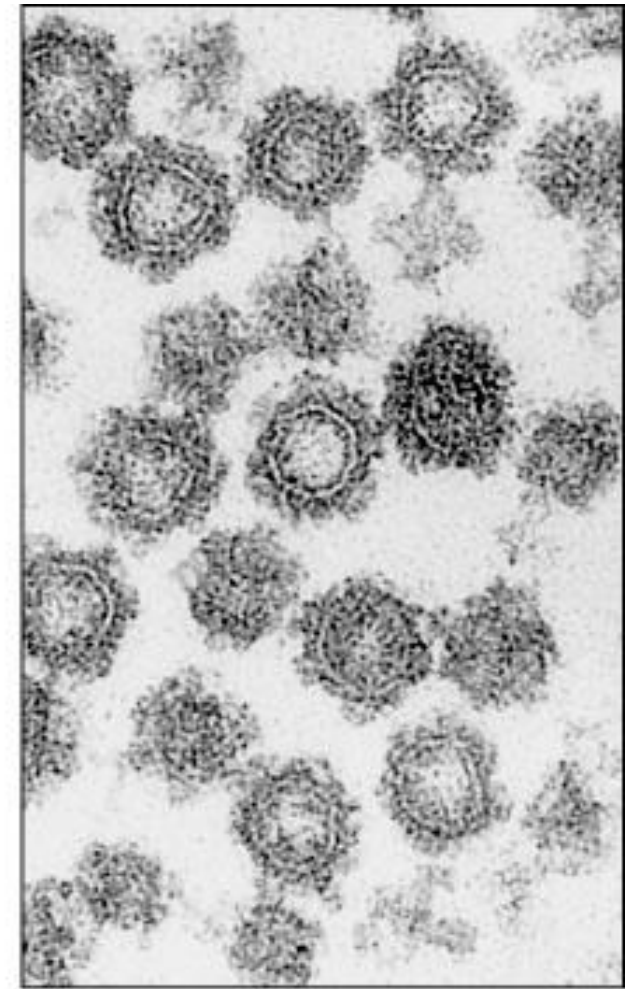
Les trois types de manteau des vésicules recouvertes



(A) clathrin

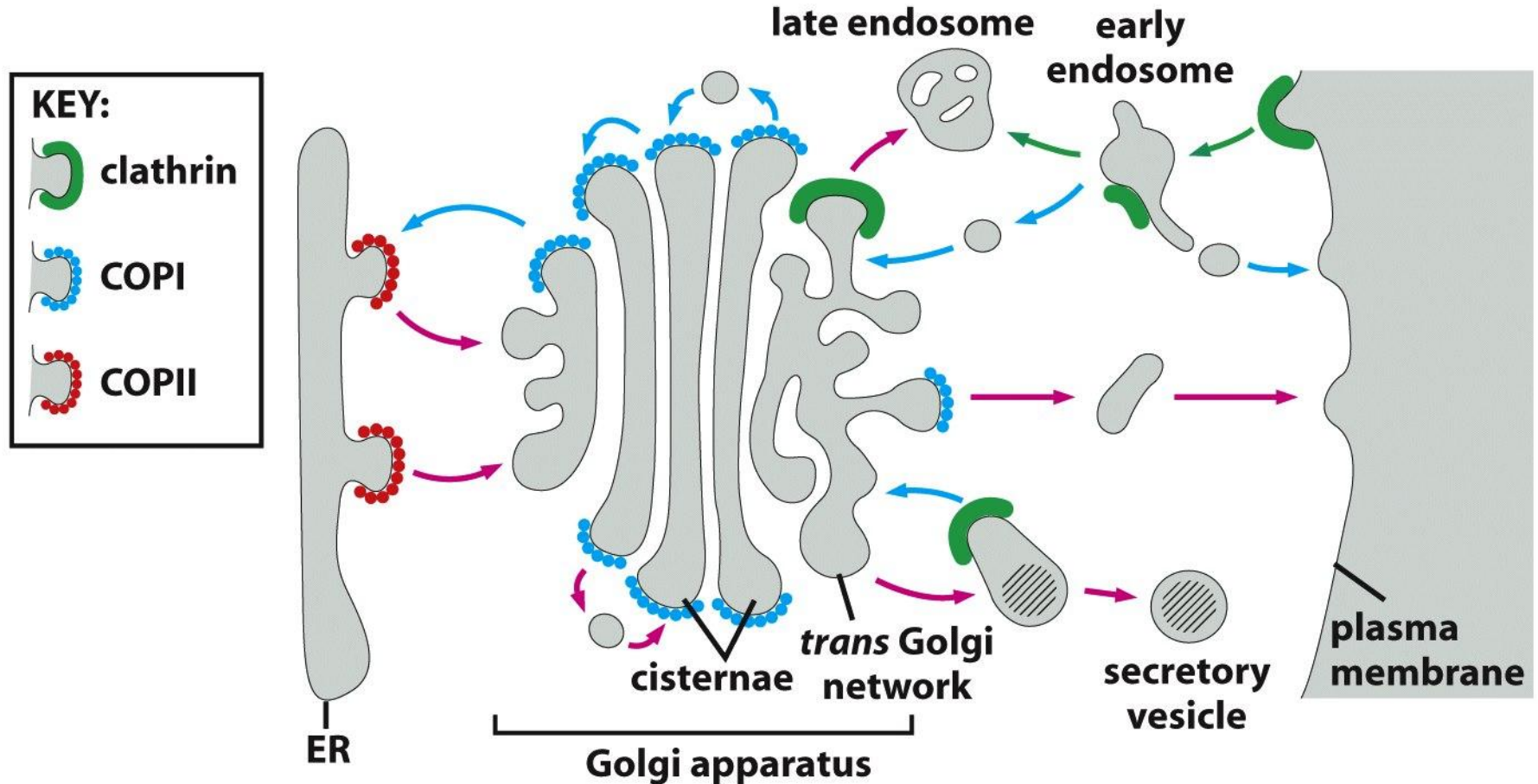


(B) COPI



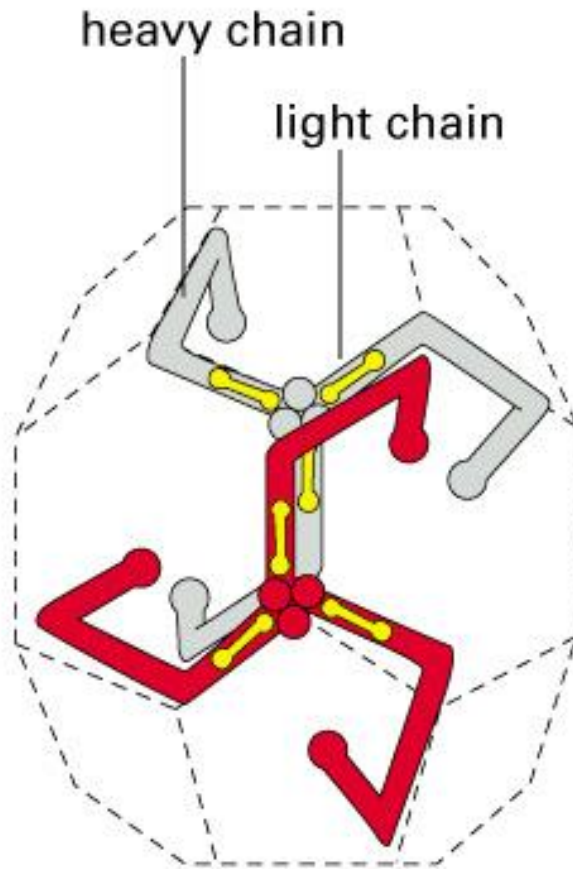
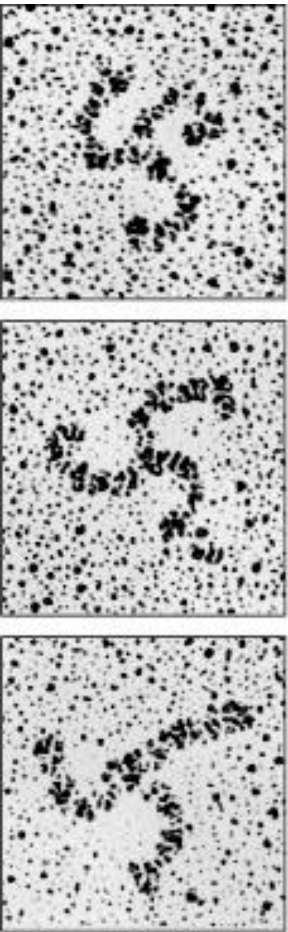
(C) COPII 100 nm

Les trois types de manteau des vésicules recouvertes

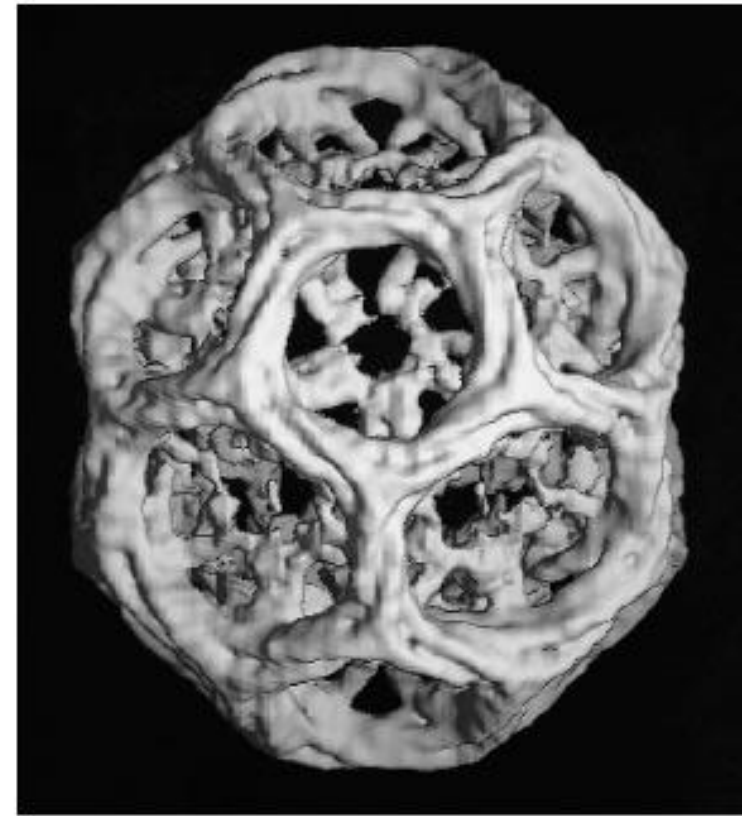


- Manteau de clathrine

(B) Deux triskélions
chaînes lourdes en gris ou rouge
chaînes légères en jaune



(C) Cryo-électro-
microphotographie

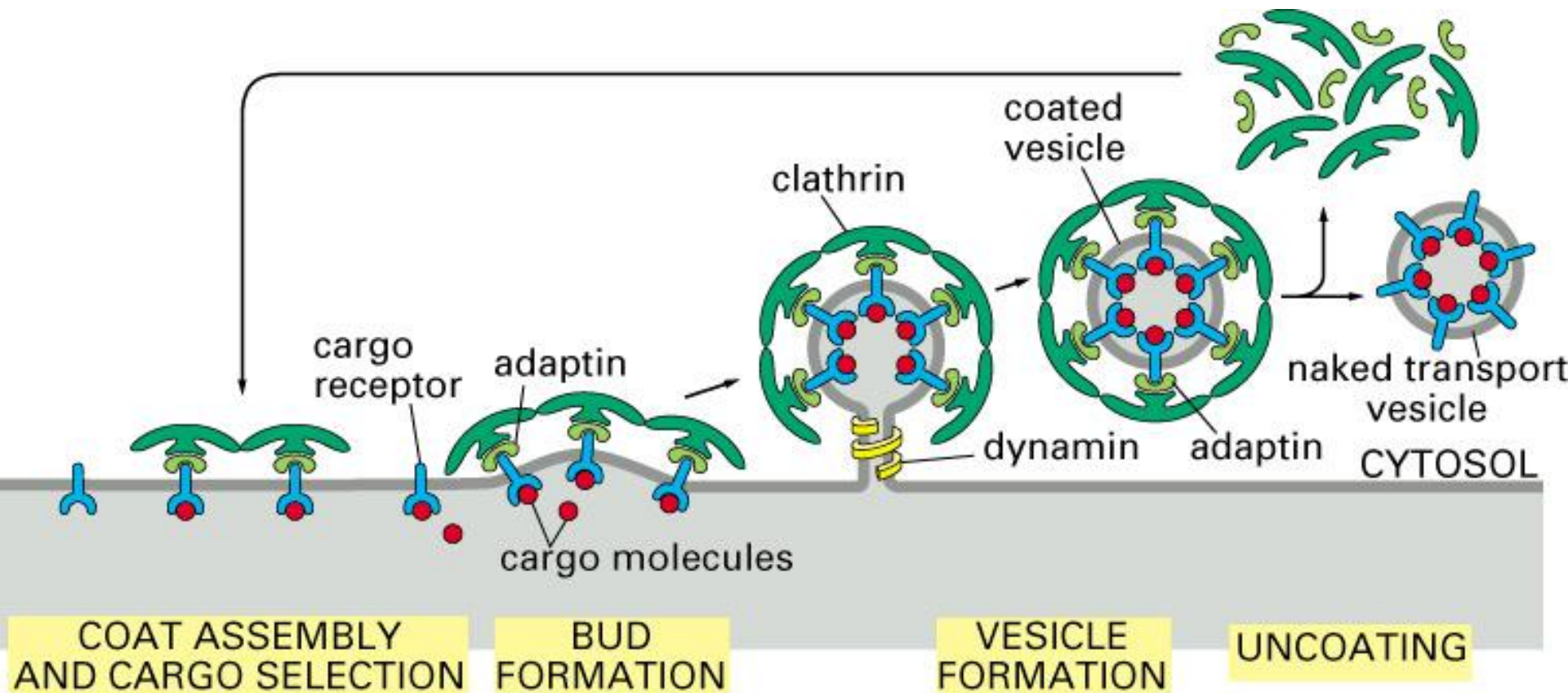


(C)

50 nm

(A) Ombrage au platine

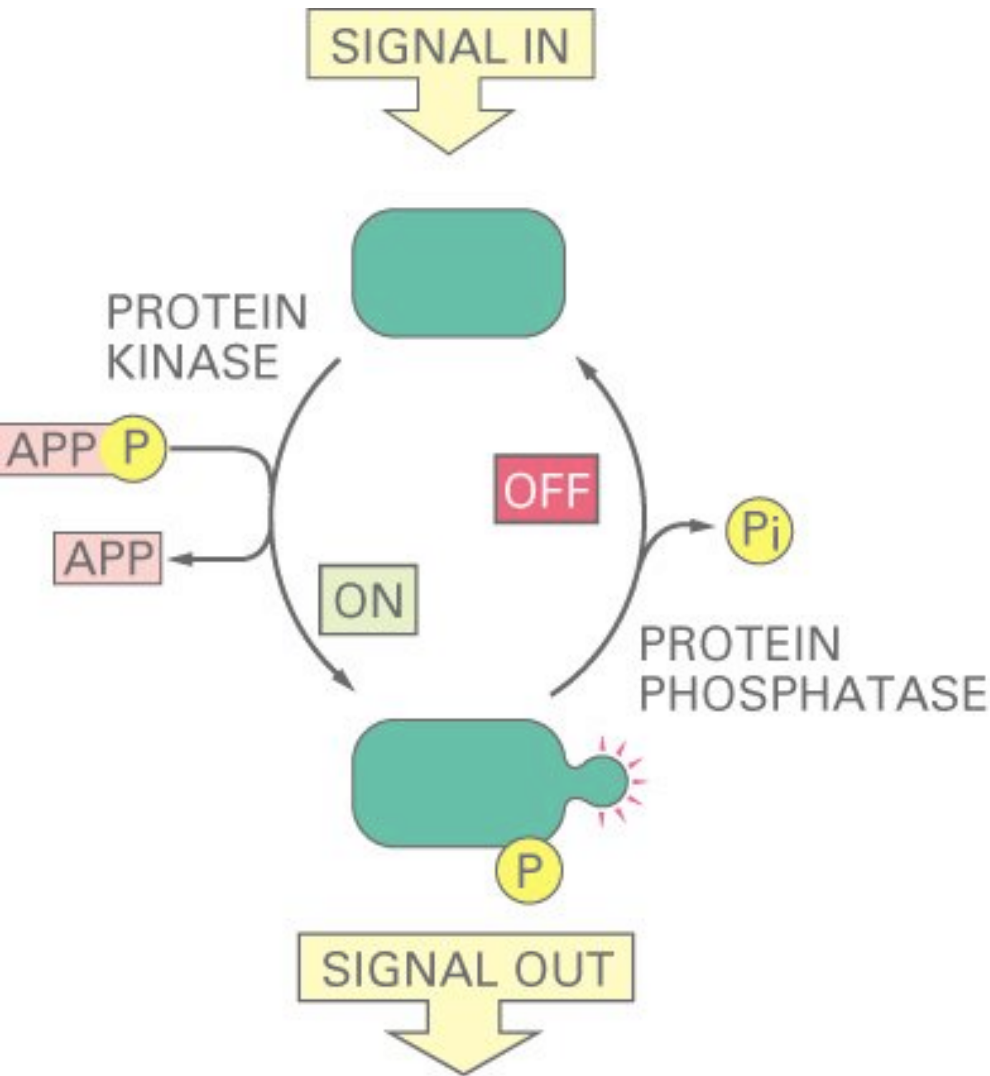
- Assemblage et désassemblage d'un manteau de clathrine
 - Les adaptines se lient à la clathrine et au complexe cargo
 - Dynamine = GTPase



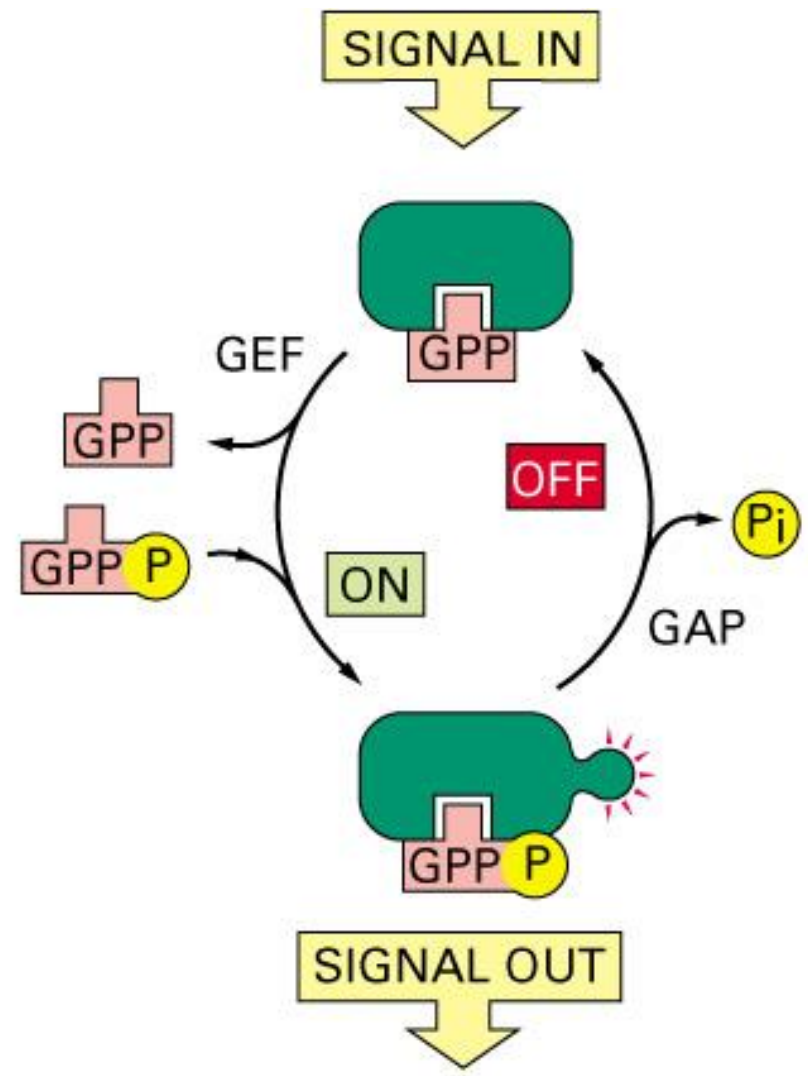
GTPases de recrutement du manteau : les acteurs

- Membrane du RE
- Sar 1 GDP (= GTPases de recrutement du manteau) forte concentration, cytosolique, inactive
- GEF (Guanine-nucleotide-Exchange Factor)

c – Contrôle de l'assemblage du manteau : GTPases monomériques, rappel



SIGNALING BY PHOSPHORYLATION

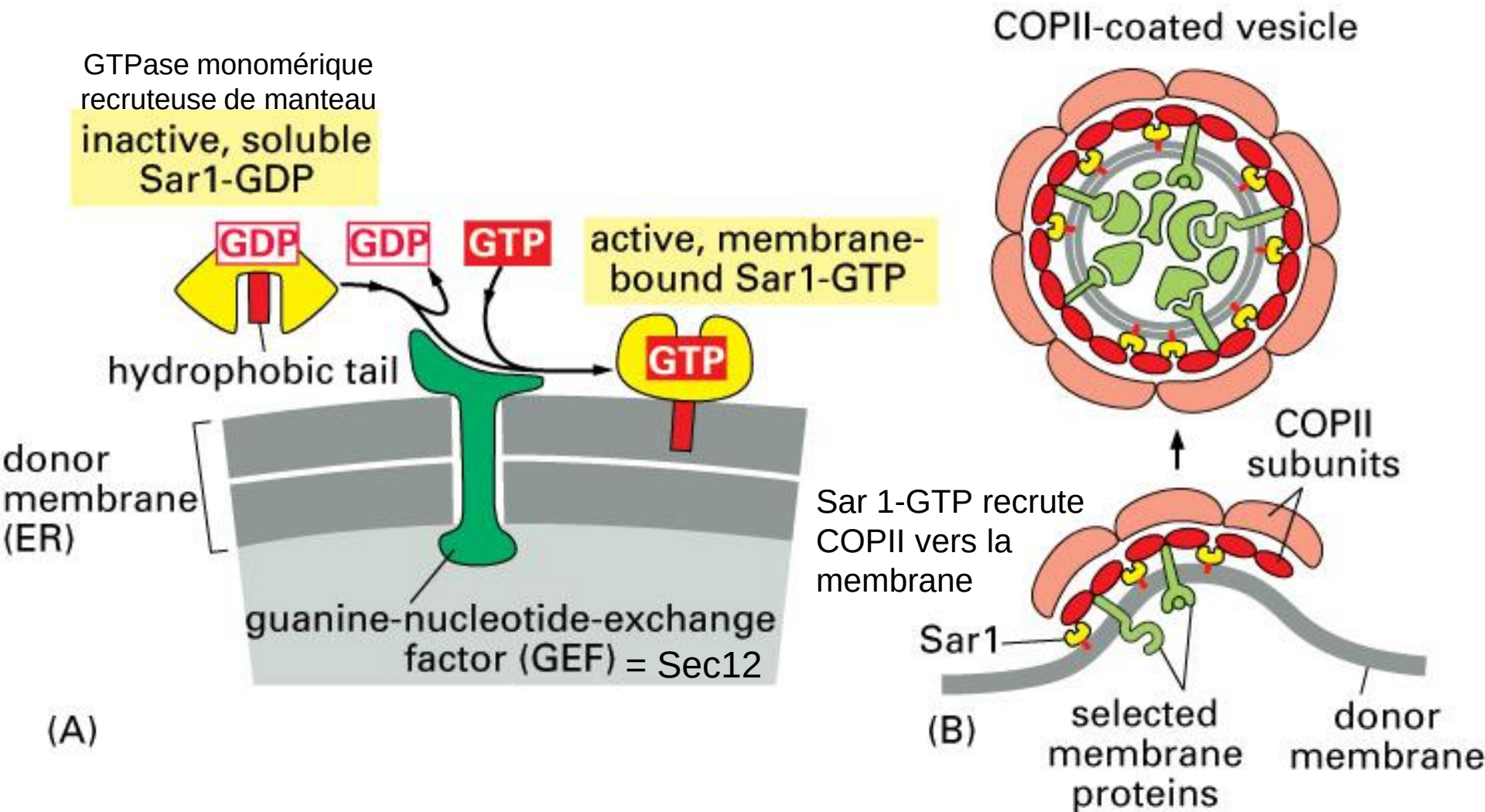


SIGNALING BY GTP-BINDING PROTEIN

Contrôle de l'assemblage du manteau : GTP binding proteins

- GTP binding proteins
 - 2 états
 - Actif avec liaison de GTP
 - Inactif avec liaison de GDP
 - 2 types
 - Monomérique (= *GTPases monomériques*) les mieux connues
 - Trimérique (= *GTPases trimériques* = *protéines G*)
- Passage d'un état à l'autre par
 - GEFs (Guanine-nucleotide-Exchange Factors) GDP → GTP
 - GAPs (GTPase-Activating Proteins) GTP → GDP

Formation d'une vésicule à COPII (RE)



Recrutement du manteau par GTPase

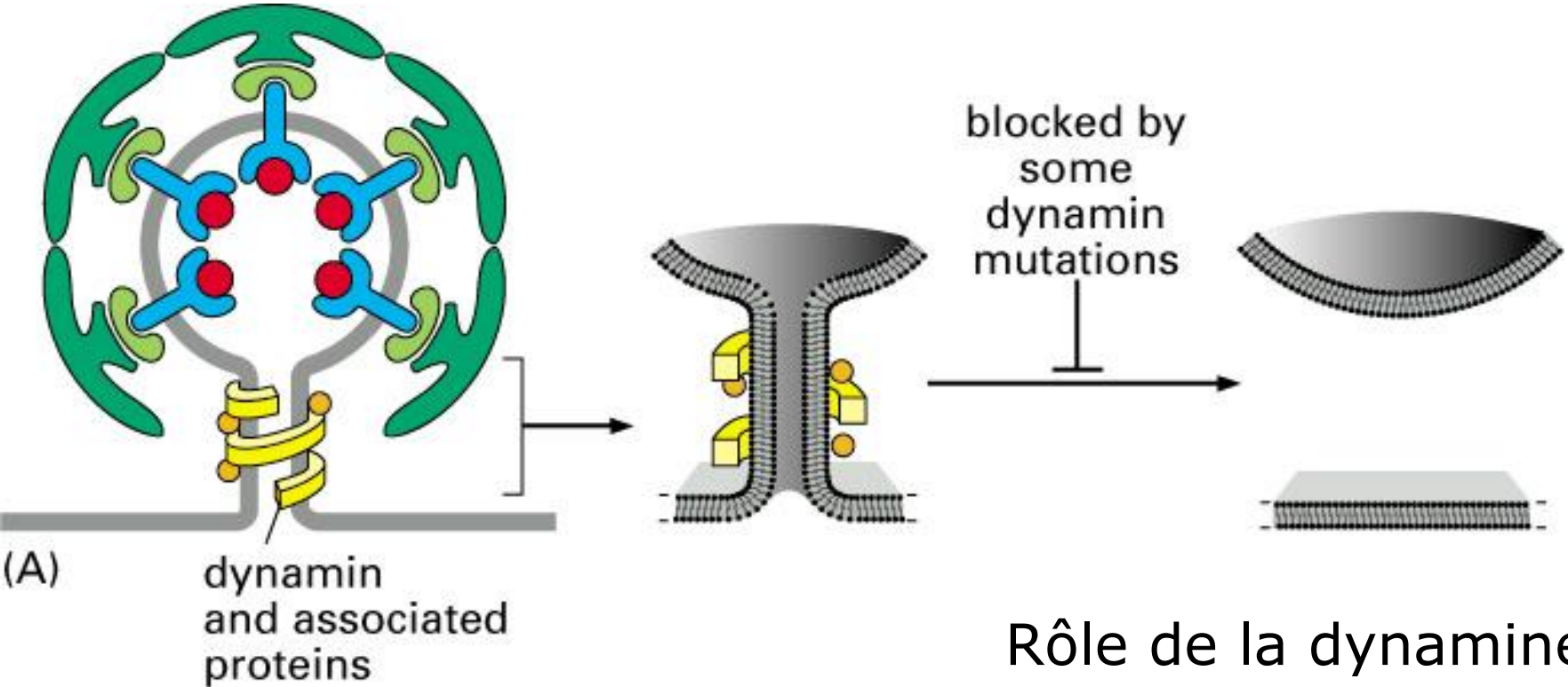
- Une vésicule à COPII est sur le point de bourgeonner (*du RE*)
- Une GEF spécifique (protéine de membrane du RE appelée Sec 12) se lie à la Sar 1 du cytosol et remplace le GDP de la Sar 1 par du GTP
- La Sar 1 GTP libère une queue d'acide gras lui permettant de se fixer dans la membrane du RE puis recrute des sous-unités de COPII
- La membrane bourgeonne en incluant des protéines membranaires sélectionnées

Désassemblage du manteau

- Hydrolyse du GTP en GDP (dépend du temps)
- La queue est exclue de la membrane → désassemblage du manteau

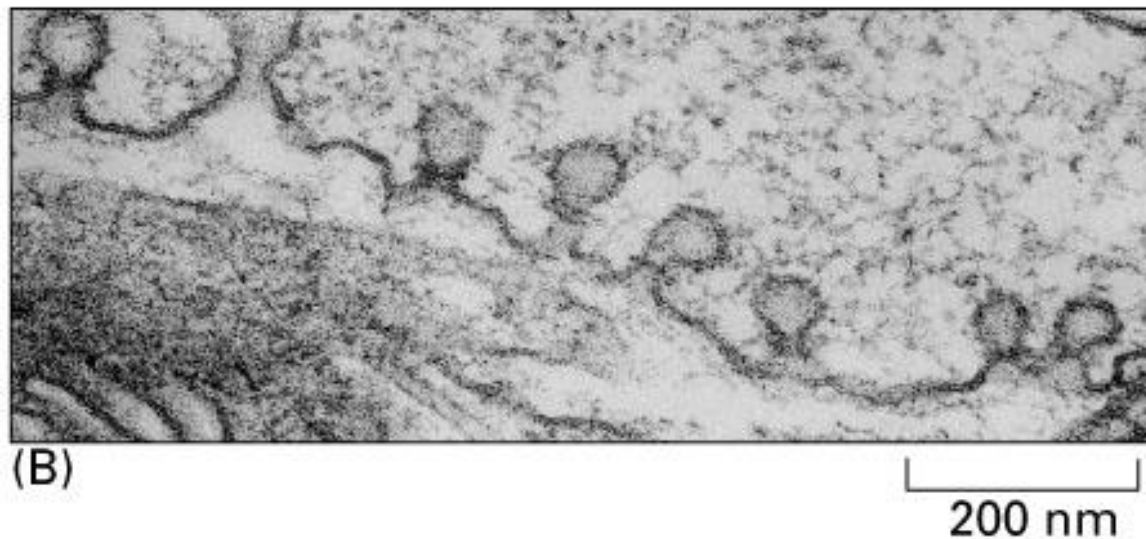
Pincement de la membrane

- Dynamine + autres protéines
- Fusion des feuillet non cytosoliques (grâce à la dynamine)



Rôle de la dynamine

Puits à clathrine dans les cellules nerveuses de drosophiles *shibire* ayant une mutation du gène de la dynamine entraînant une paralysie. Anneau correspondant à la dynamine mutée



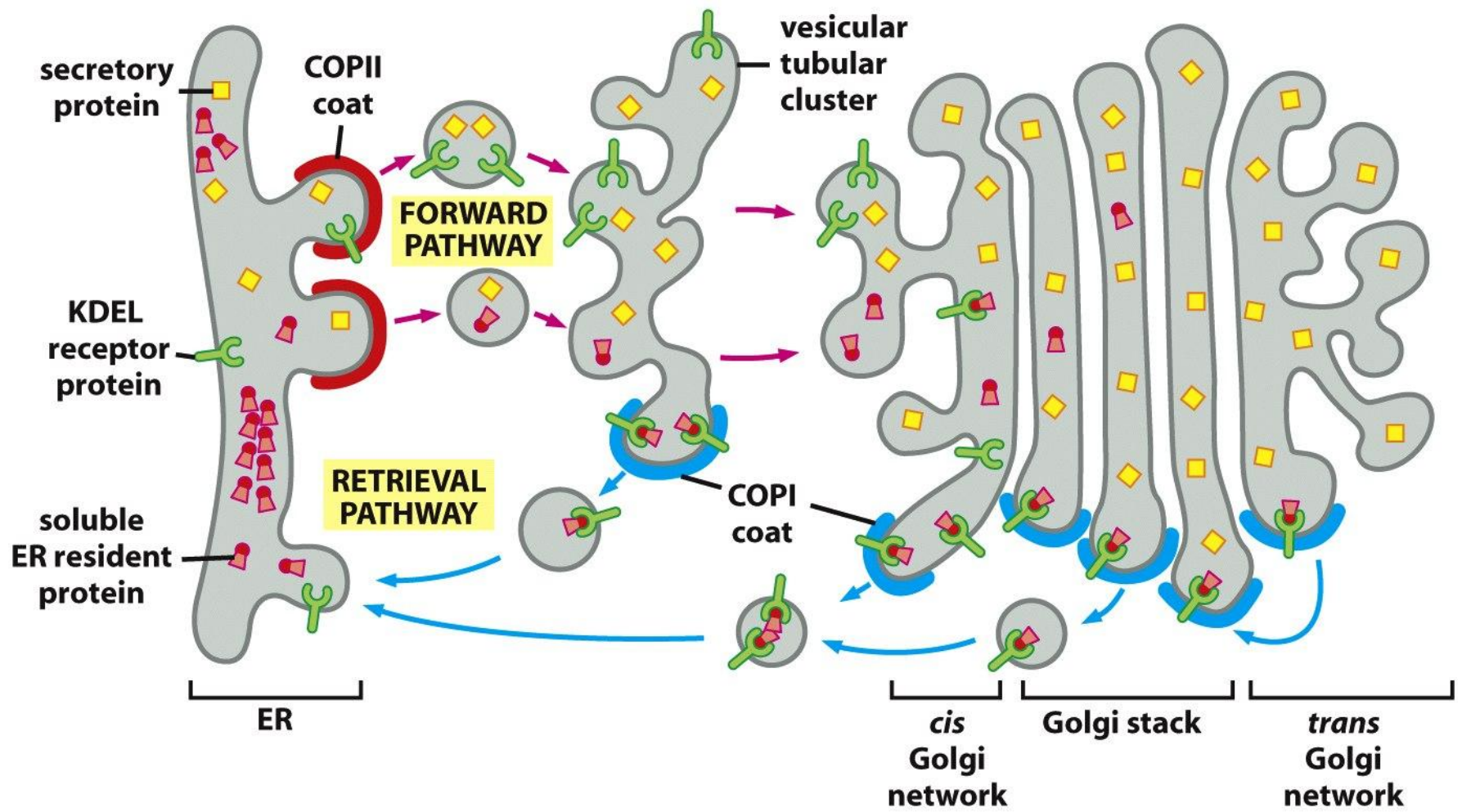


Figure 13-24b *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Guidage du transport

- Reconnaissance vésicule de transport $\leftrightarrow$ membrane cible
- Toutes les vésicules de transport ont des marqueurs de surface spécifiques de leur origine et de leur cargo
- Les membranes cible ont des récepteurs complémentaires

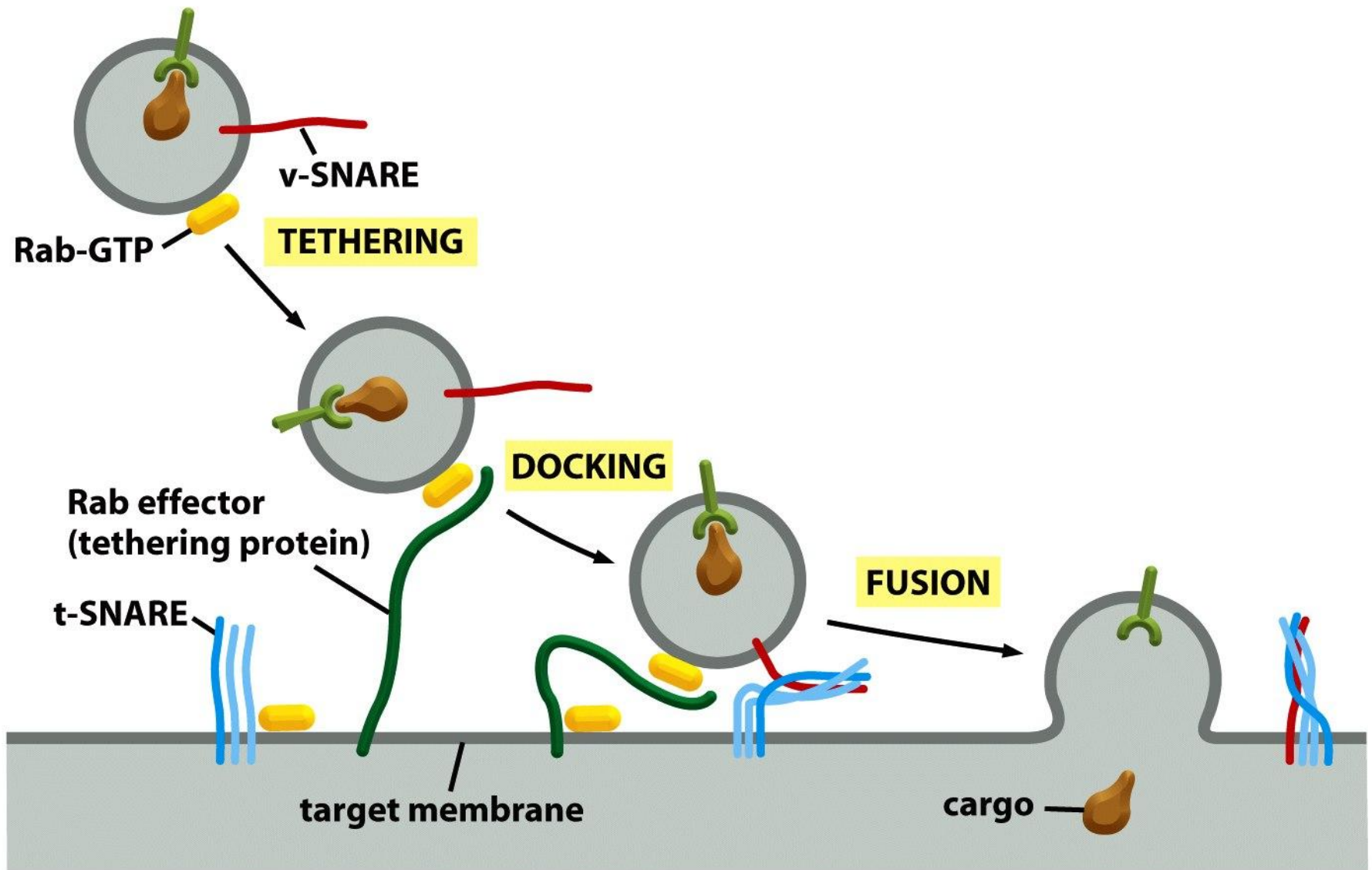


Figure 13-14 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Amarrage: Protéines Rab

- Rôle important des protéines Rab dans la spécificité du transport vésiculaire
- GTPases monomériques
- Plus de 30 membres → la plus grande sous-famille de GTPases monomériques
- Distribution caractéristique sur les membranes cellulaires
- Chaque organite a au moins une protéine Rab sur sa face cytosolique
- Facilitent et régulent
 - Le taux d'amarrage des vésicules
 - et l'appariement des v- t- SNAREs

Les effecteurs de Rab

- Reconnaissance de Rab (Lié, GTP) par un Rab effecteur
- Parfois longues protéines filamenteuses qui limitent le mouvement des vésicules entre des citernes golgiennes adjacentes
- Se lient à Rab et empêchent l'hydrolyse prématurée du GTP
- D'autres sont des moteurs qui dirigent les vésicules vers leur destination

- Localisation sub-cellulaire de quelques protéines Rab

PROTEIN	ORGANELLE
Rab1	ER and Golgi complex
Rab2	<i>cis</i> Golgi network
Rab3A	synaptic vesicles, secretory granules
Rab4	early endosomes
Rab5A	plasma membrane, clathrin-coated vesicles
Rab5C	early endosomes
Rab6	<i>medial</i> and <i>trans</i> Golgi cisternae
Rab7	late endosomes
Rab8	secretory vesicles (basolateral)
Rab9	late endosomes, <i>trans</i> Golgi network

Fusion

- Distinguer amarrage de fusion
- Fusion ne fait pas toujours suite à amarrage :
 - *eg* : exocytose régulée
- Amarrage : les protéines des membranes interagissent et adhèrent
- Fusion : les couches lipidiques peuvent se joindre $\Rightarrow$ nécessité d'extrusion d'eau $\Rightarrow$ protéines de fusion pour résoudre le problème énergétique ($\approx$ dynamine au cours du bourgeonnement des vésicules à clathrine)

SNAREs

- Au moins 20 espèces différentes
- Protéines trans-membranaires
- Marchent par deux :
 - v- SNAREs (vesicle)
 - t- SNAREs (target = cible)
- Domaine hélicoïdal qui s'enroule l'un dans l'autre → complexe *trans*-SNARE qui contribue à la fusion des membranes

Abréviations

- SNAREs : SNAP receptors
- SNAPs : soluble NSF attachment proteins
- NSF : N-ethylmaleimide-sensitive-fusion protein

Complexe *trans*-SNARE

- Toujours 4 hélices α
 - 3 formées par t-SNARE
 - 1 formée par v-SNARE
- Ici 3 protéines
 - v-SNARE 1 hélice (synaptobrevine)
 - t-SNARE 1 hélice (syntaxine)
 - t-SNARE 2 hélices (Snap25 : protéine périphérique)

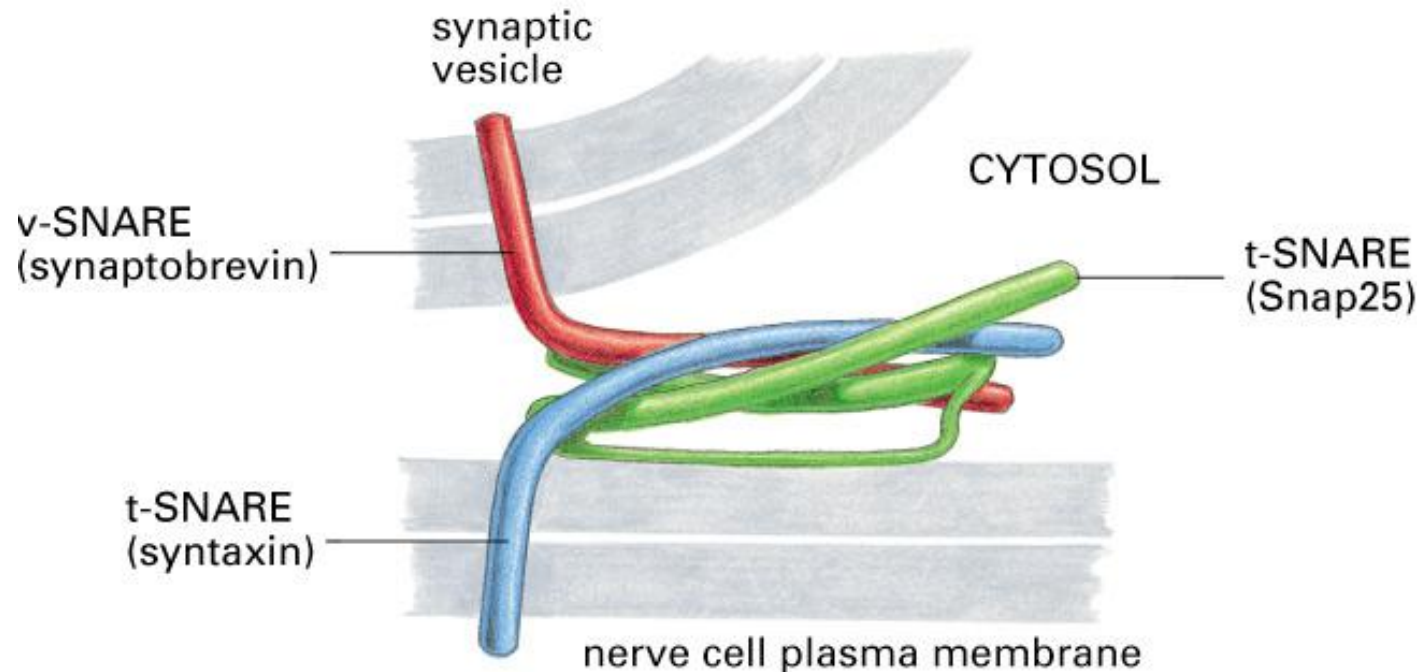
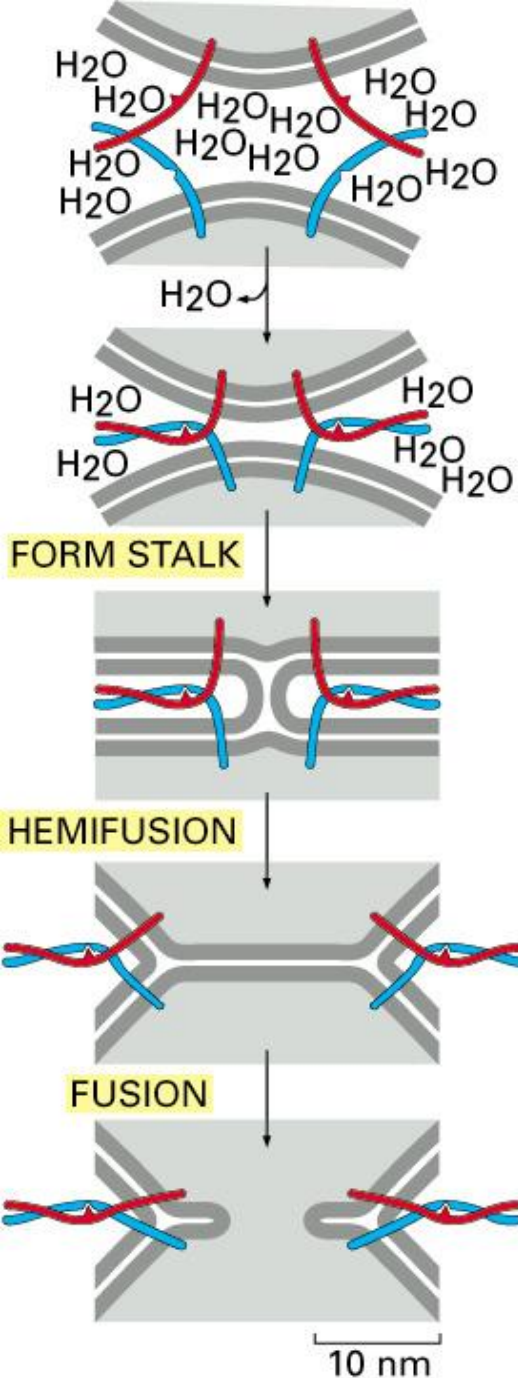


Figure 13–12. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.



• Modèle de concentration des protéines SNAREs au cours de la fusion de membrane

- Des liposomes (*in vitro*) v-SNAREs + des liposomes t-SNAREs → fusion lente ⇒
- Intervention (dans la cellule) d'autres protéines
 - pour initier la fusion
 - ou pour retirer des protéines inhibitrices

NSF

- Cycle entre les membranes et le cytosol
- Catalyse le désassemblage
- ATPase
- Ressemble à une chaperone cytosolique qui solubilise et aide à replier correctement les protéines dénaturées
- Déroule les hélices des SNAREs
- en collaboration avec des protéines adaptatrices

- Dissociation d'une paire *v*-SNARE *t*-SNARE par NSF une fois le cycle de fusion terminé
 - NSF + des protéines adaptatrices → hydolyse ATP + séparation des SNAREs
 - La dissociation régule quand et où les membranes vont fusionner

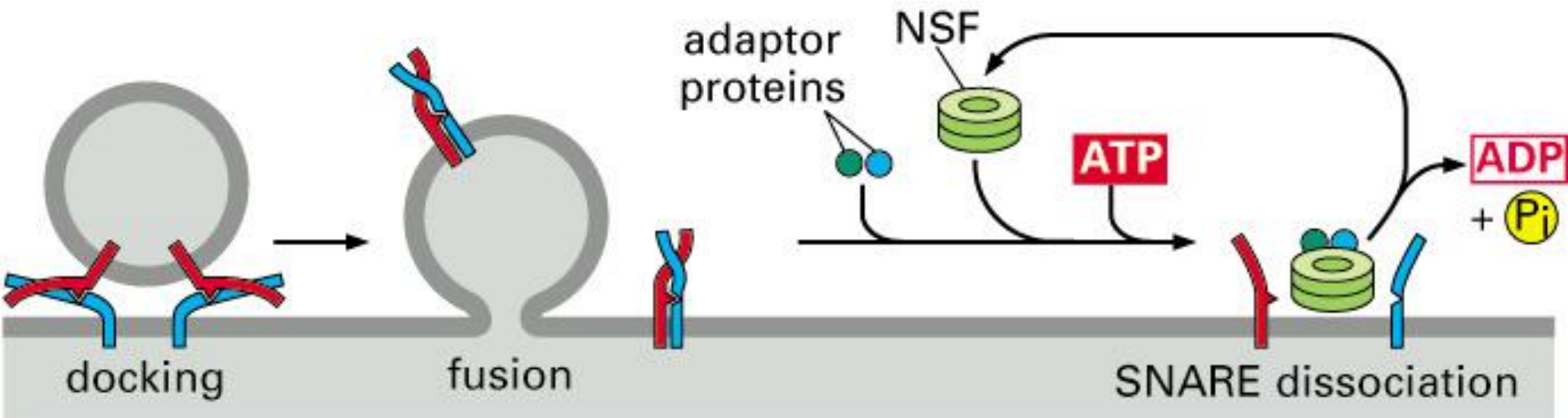
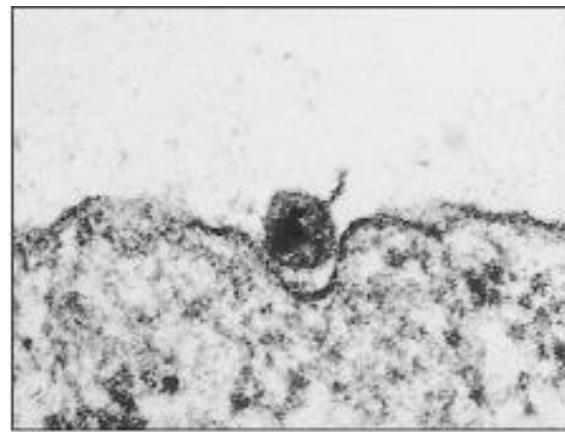


Figure 13–13. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Importance des phénomènes de fusion de membrane

- Transport vésiculaire
- Division cellulaire
- Fécondation (fusion oosome spermatozoïde)
- Fusion des myoblastes
- Maintien de l'identité des cellules
- Maintien de l'identité des compartiments intra-cellulaires
- Mode d'entrée des virus à **enveloppe** dans les cellules

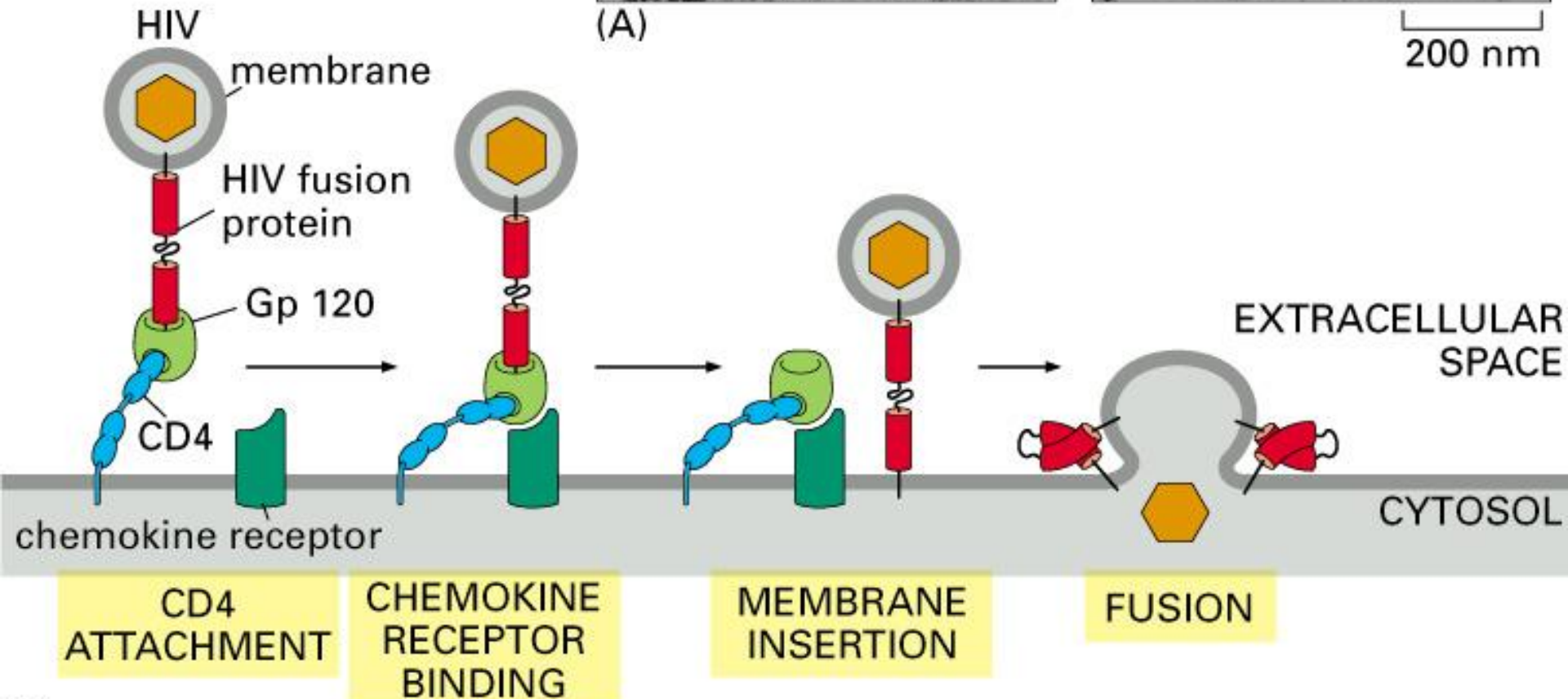
Entrée d'un virus à enveloppe dans la cellule



(A)



200 nm



(B)

EXOCYTOSE

- **Constitutive**
- **Régulée; exemple: vésicules synaptiques**

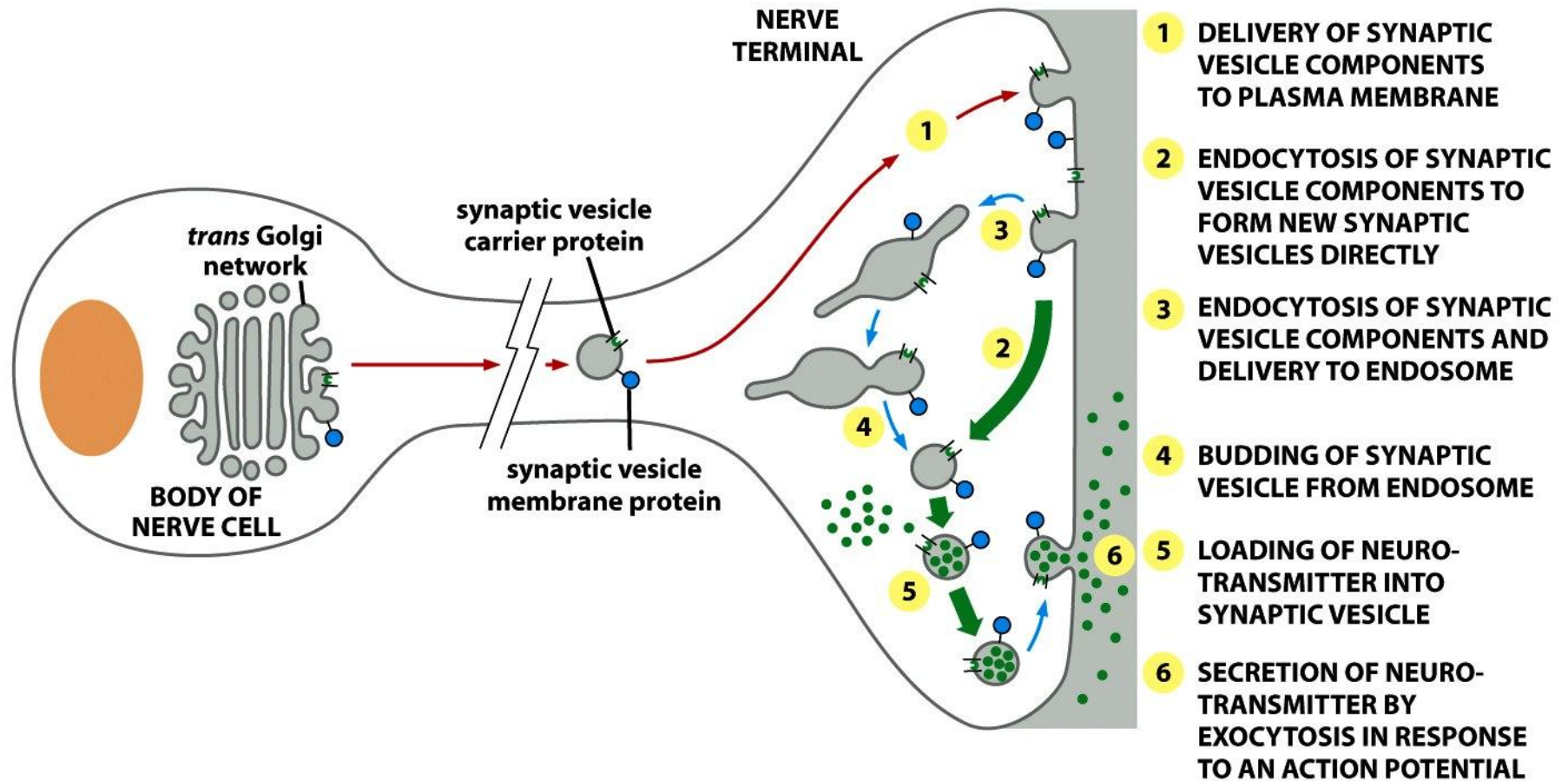
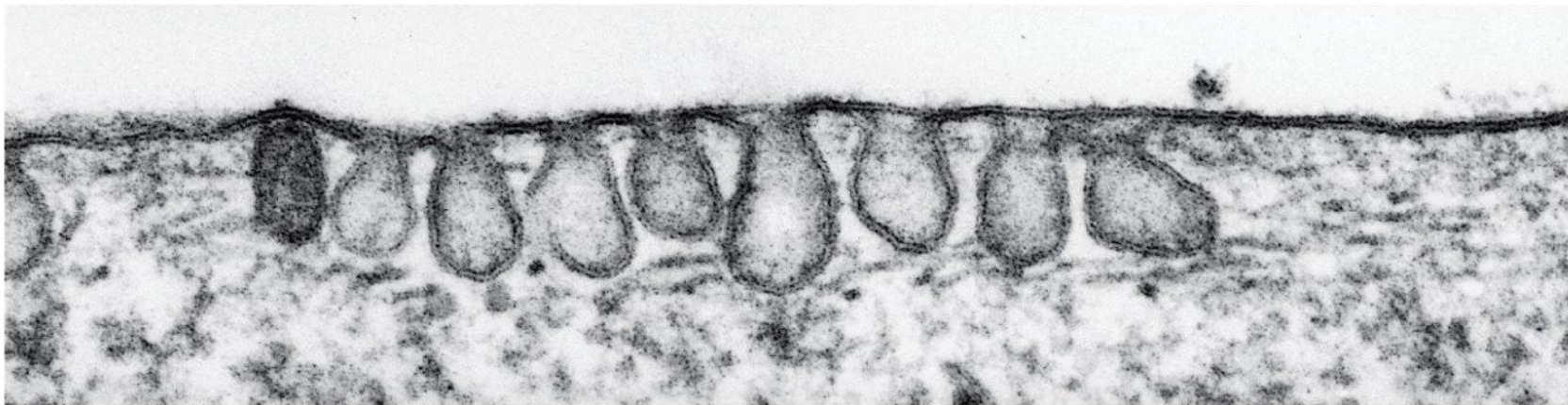


Figure 13-73 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

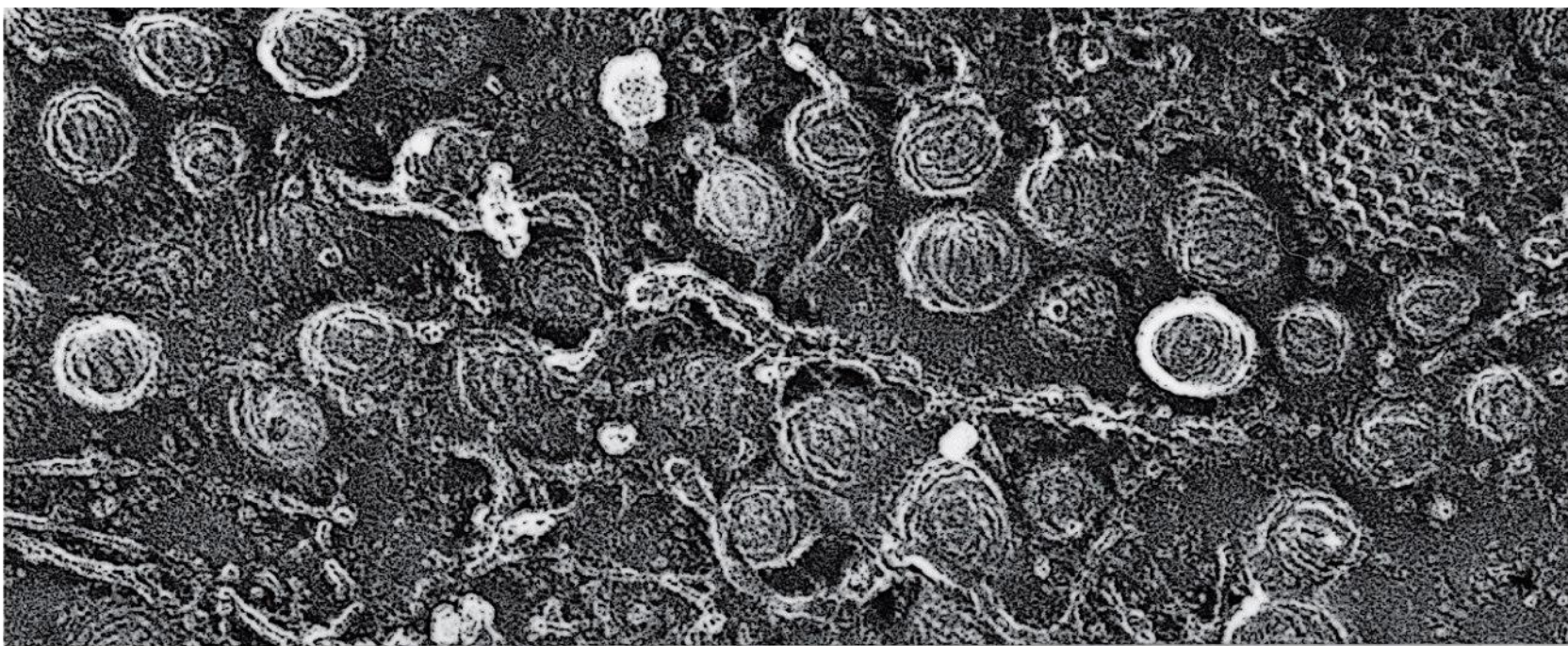
SNAREs nerveuses

- Cibles de neurotoxines
 - Tétanos
 - Botulisme
- Protéases qui entrent dans des neurones spécifiques, clivent les SNAREs et bloquent la transmission synaptique

(A)



(B)



0.2 μm

Endocytose

- Phagocytose > 250 nm

- Ex: macrophages englobent 10^{11} hématies sénéscentes/j
 - Déclenchée par activation de récepteurs ; entraînent un remaniement de l'actine (activation de Rho; switch on de PI kinase; augmentation de PI(4,5)P2 qui active sa polymérisation
- Phagocytent des billes; la phagocytose dépend d'activation mais aussi d'inhibition (don't eat me!)

- Pinocytose < 100nm

- Transport constitutif. Important: fibroblaste: 1% de la membrane /mn est recyclée)
- Clathrin coated pits: 2% de la surface de la MP. Détachement de 2500 vésicules/mn
- Cavéoles: transcytose dans les cellules épithéliales

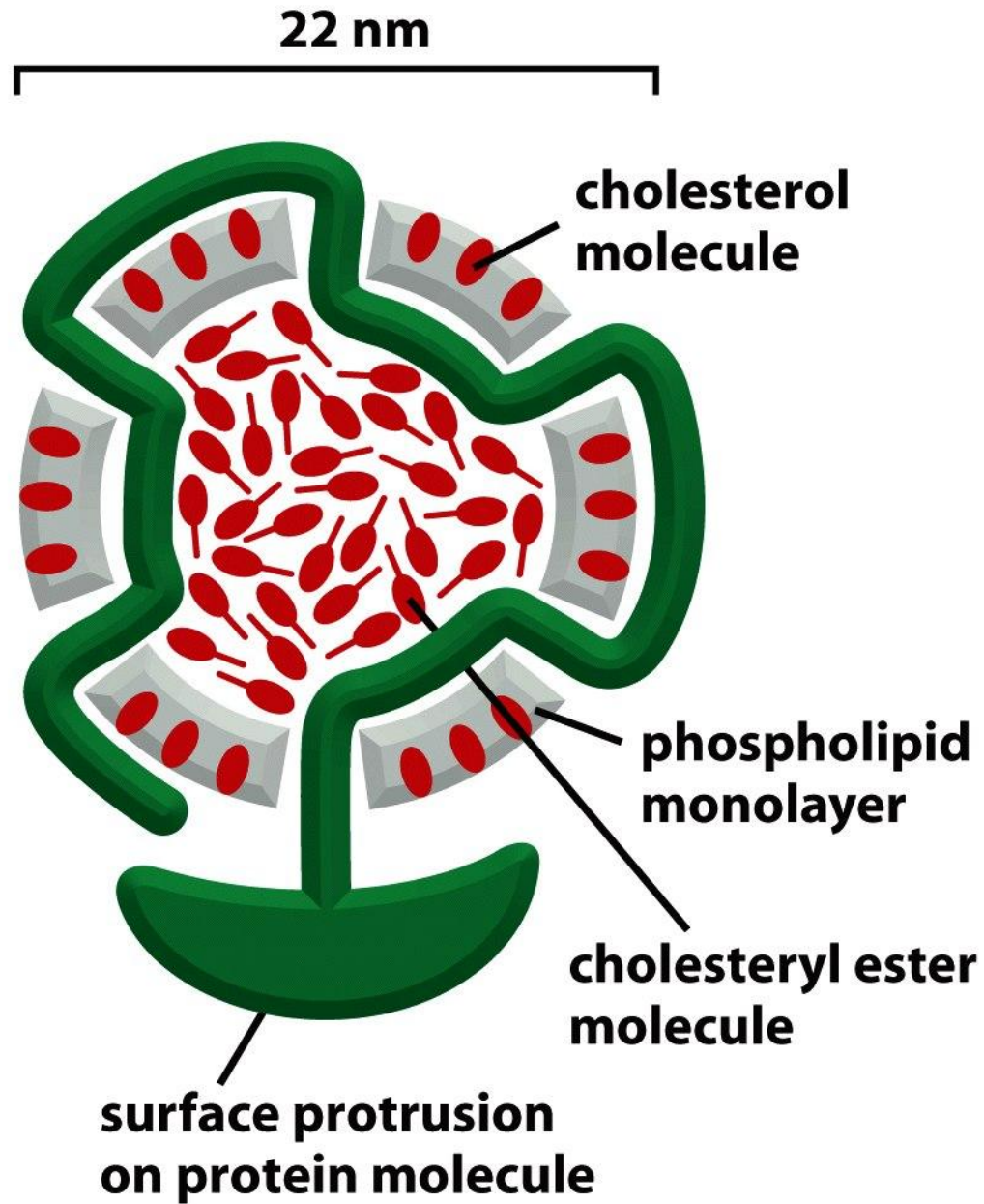


Figure 13-50 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

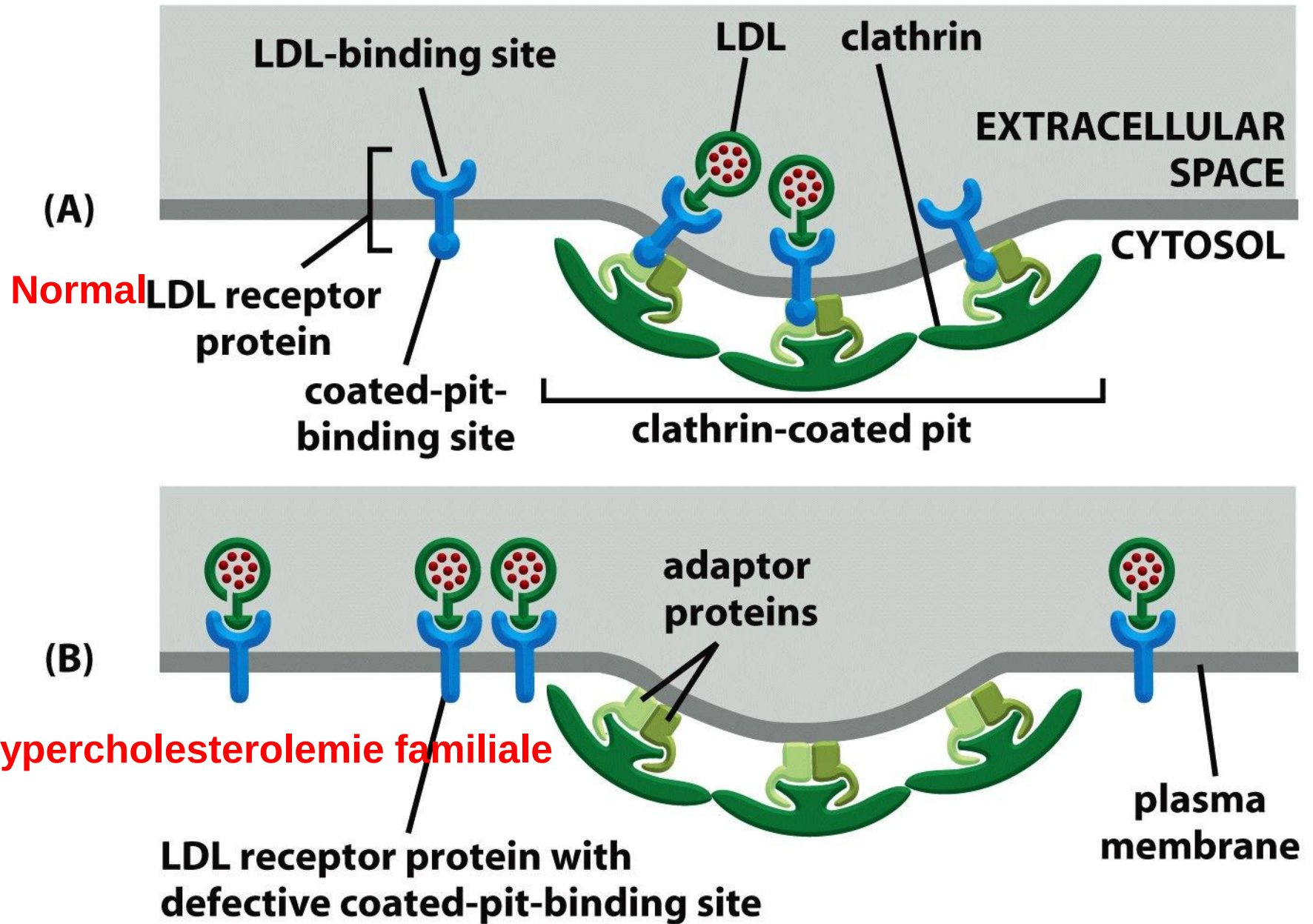


Figure 13-51 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Résumé

- Les manteaux
- GTPases (Sar1 et ARF)
- GTPases (Rab)
- SNAREs