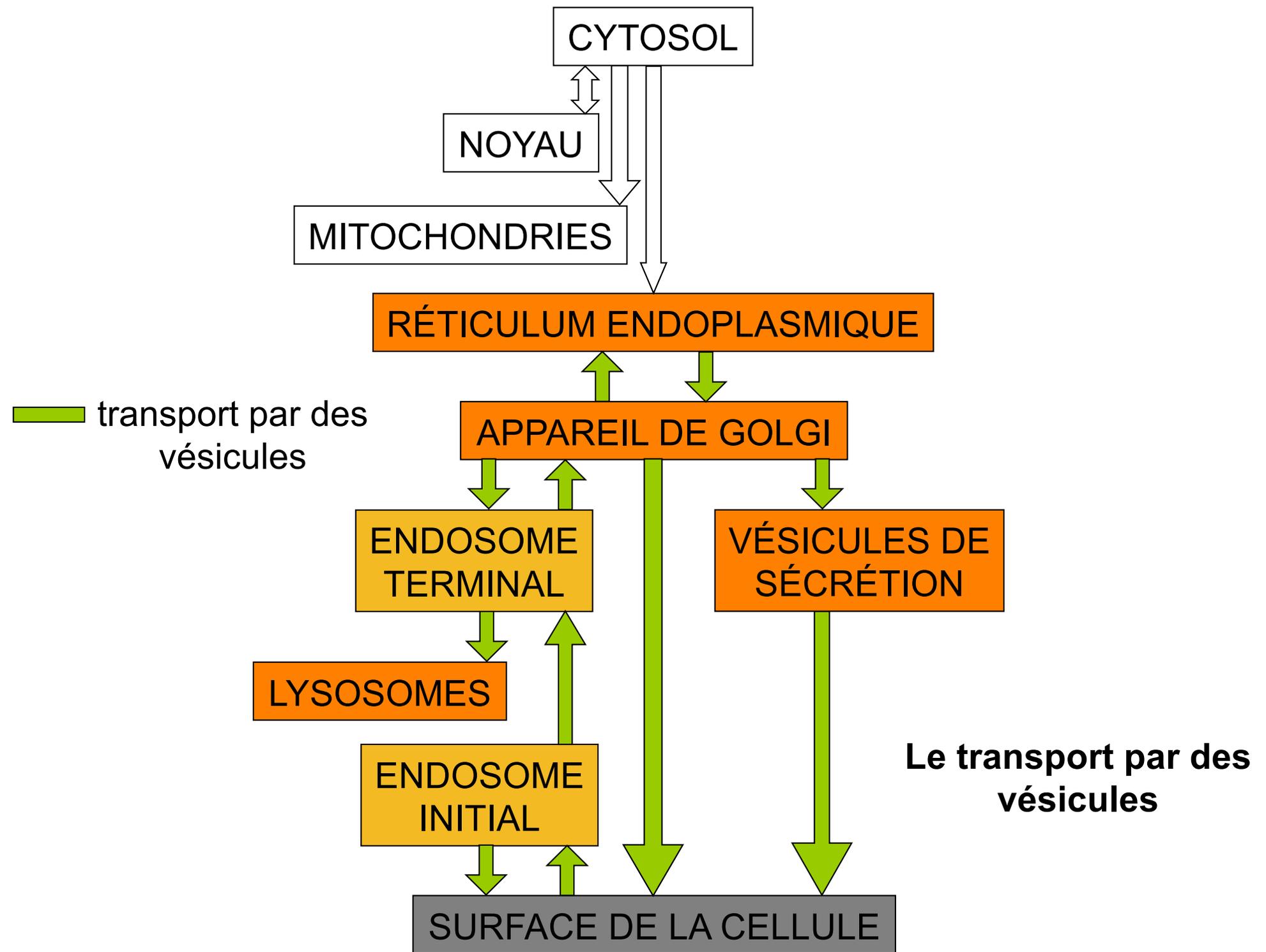
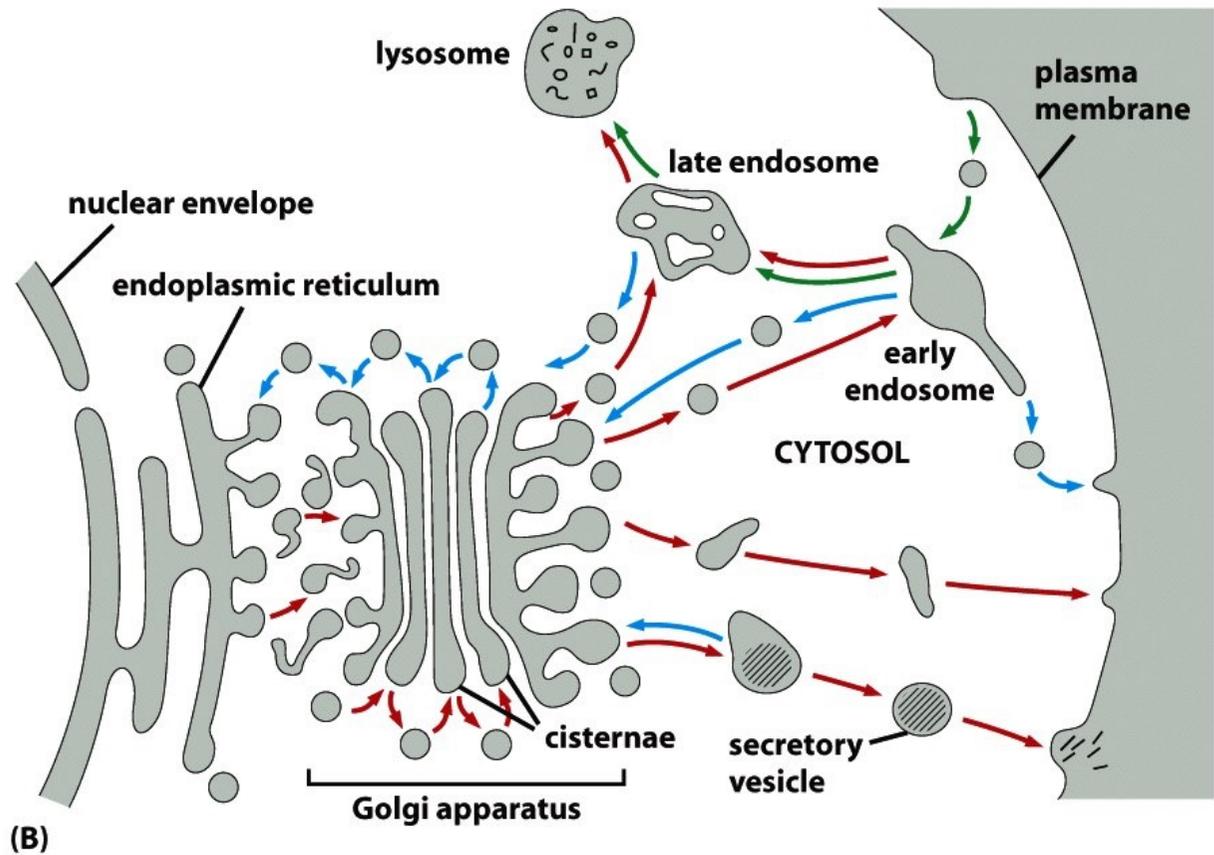
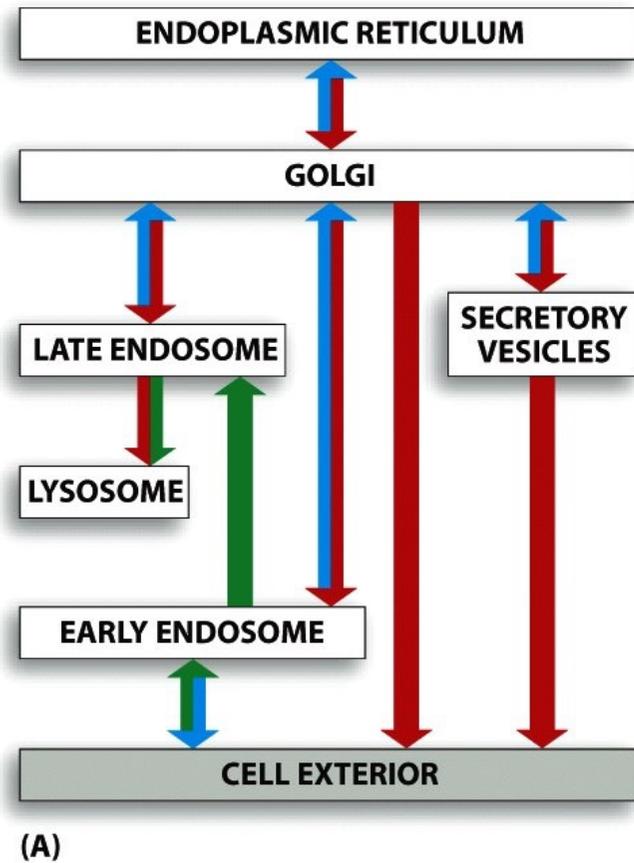


**TRAFIC VESICULAIRE ANTÉROGRADE:
DU RETICULUM À LA MEMBRANE PLASMIQUE**



-Au moins 10 compartiments chimiquement distincts avec une membrane

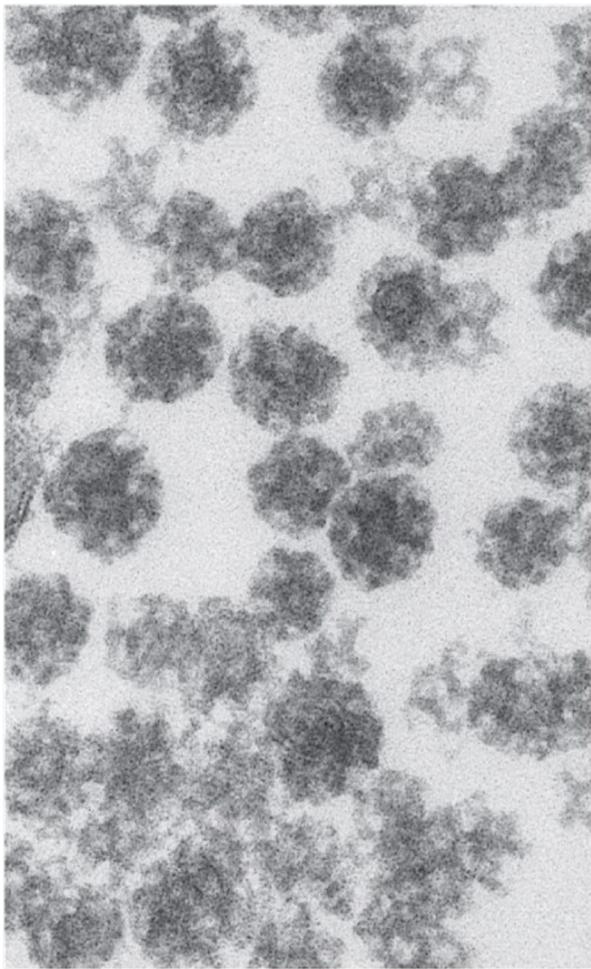


Mécanisme de transport des cargos (=cargaisons)

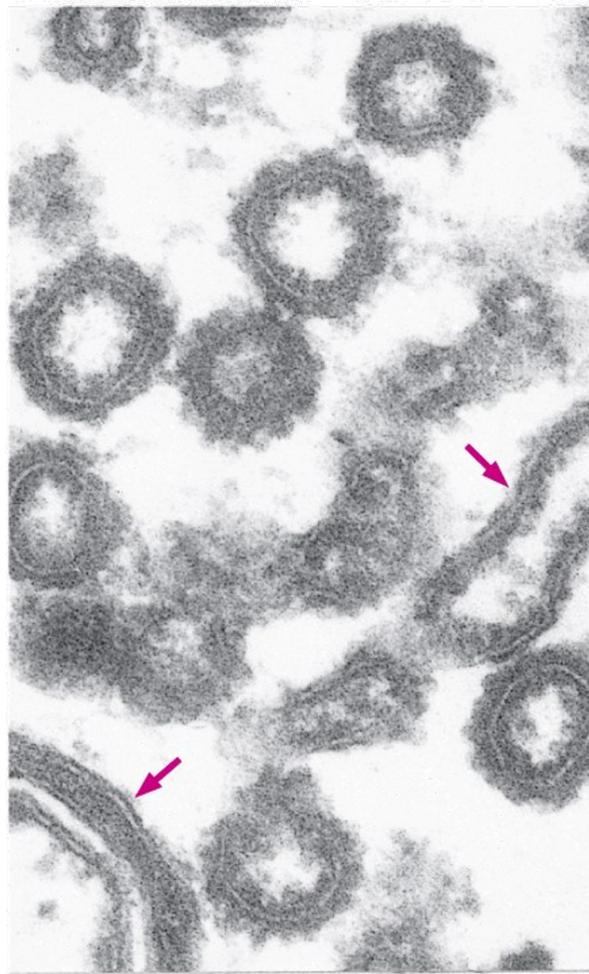
- **Séquences cibles** portées par les cargos (et/ou leur récepteur)
- Signaux apparents sur la face cytosolique, directement pour protéines transmembranaires, indirectement par l'intermédiaire d'un récepteur transmembranaire, pour les protéines luminales

Mécanisme de transport des cargos

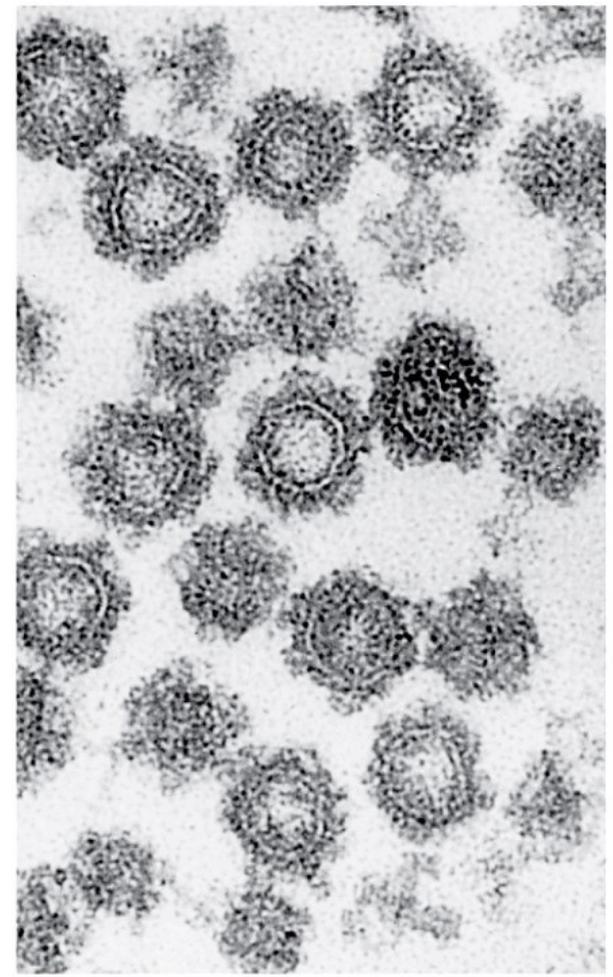
- **Séquences cibles** portées par les cargos (et/ou leur récepteur)
- Signaux apparents sur la face cytosolique, directement pour protéines transmembranaires, indirectement par l'intermédiaire d'un récepteur transmembranaire, pour les protéines luminales
- **Bourgeonnement** et émission de **vésicules couvertes** (coated) :
 - **clathrine**
 - **COPI, COPII**



Clathrine



COPI

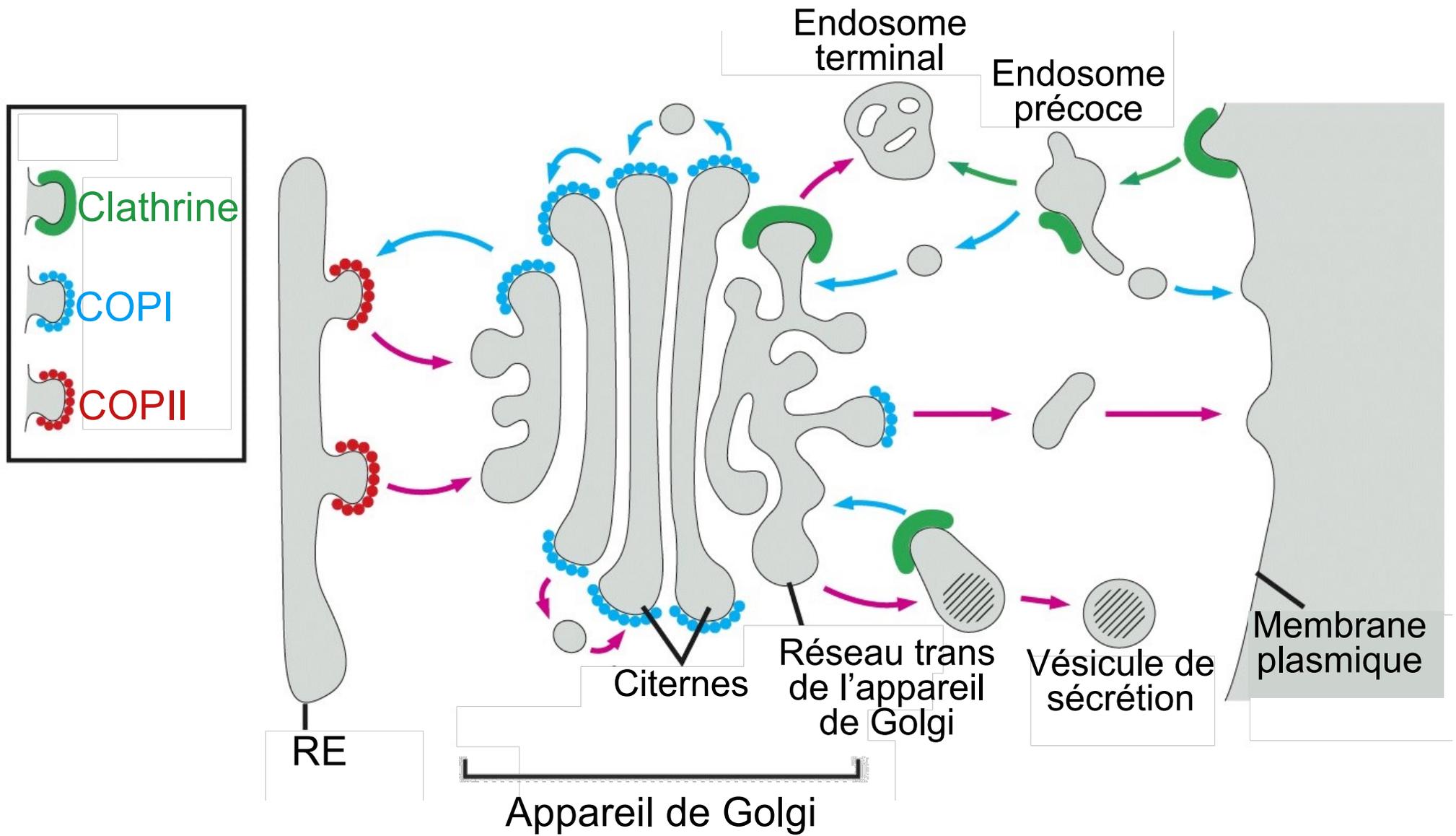


COPII

100 nm

COP = « **C**oat **P**rotein »
Protéine de la couverture

Vésicules recouvertes de couverture des trois types (ME à la même échelle)

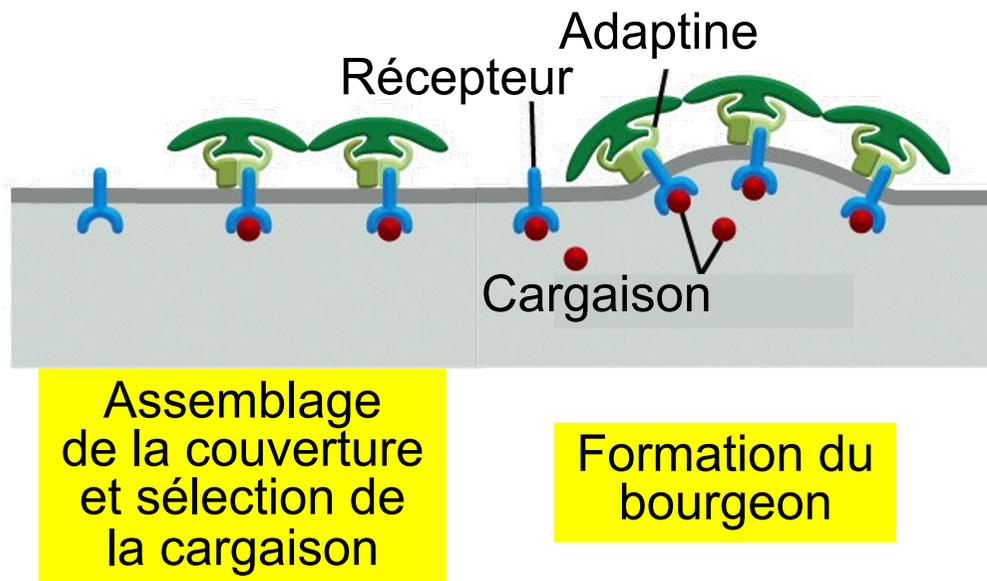


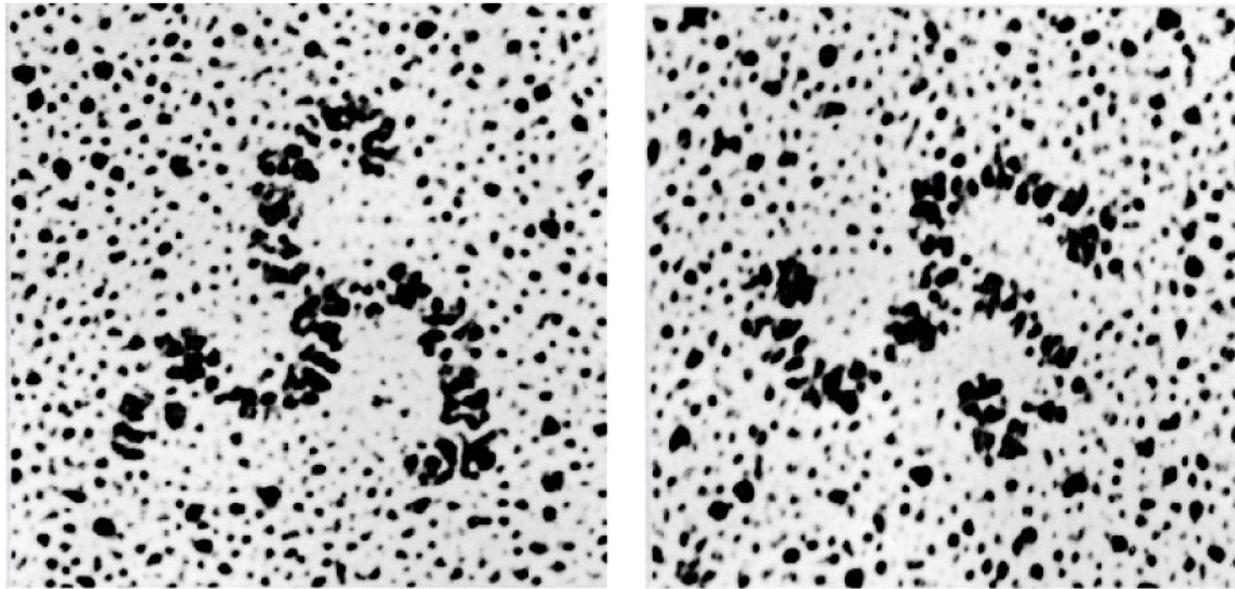
Différentes couvertures selon l'origine et la destination des vésicules

Mécanisme de transport des cargos

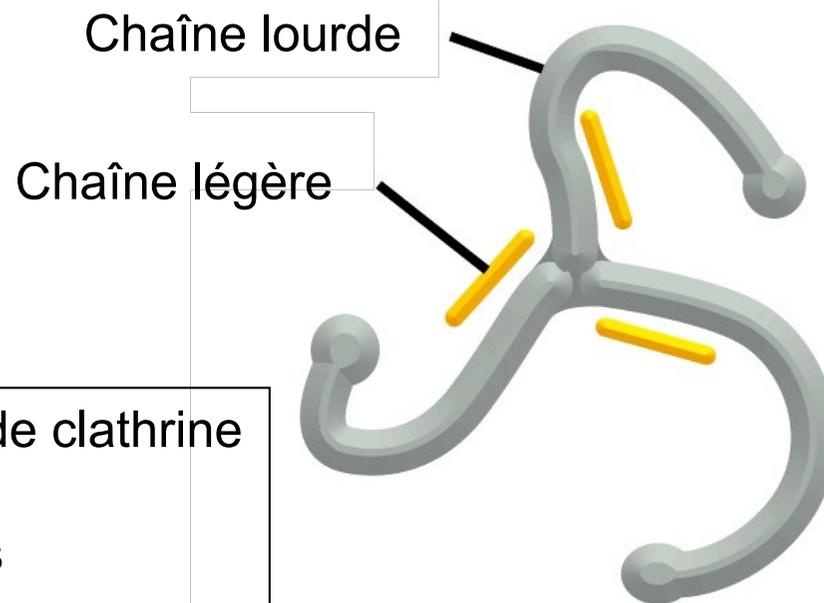
Exemple des vésicules recouverte de clathrine

- Clathrine soluble dans cytoplasme
- protéine membranaire cible reconnue par 1 adaptine, qui recrute la clathrine
- déformation de la membrane





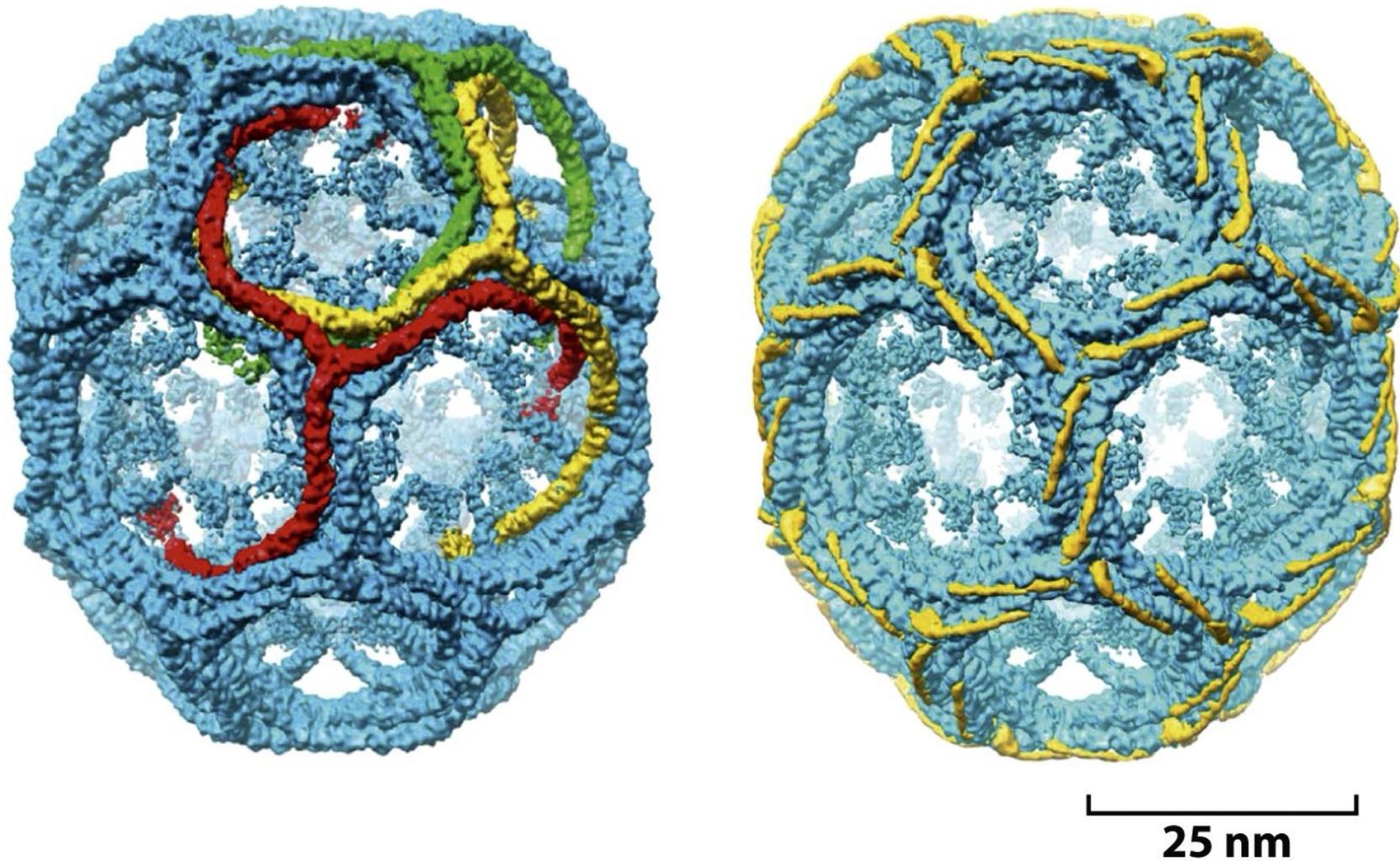
Triskélion vu au ME



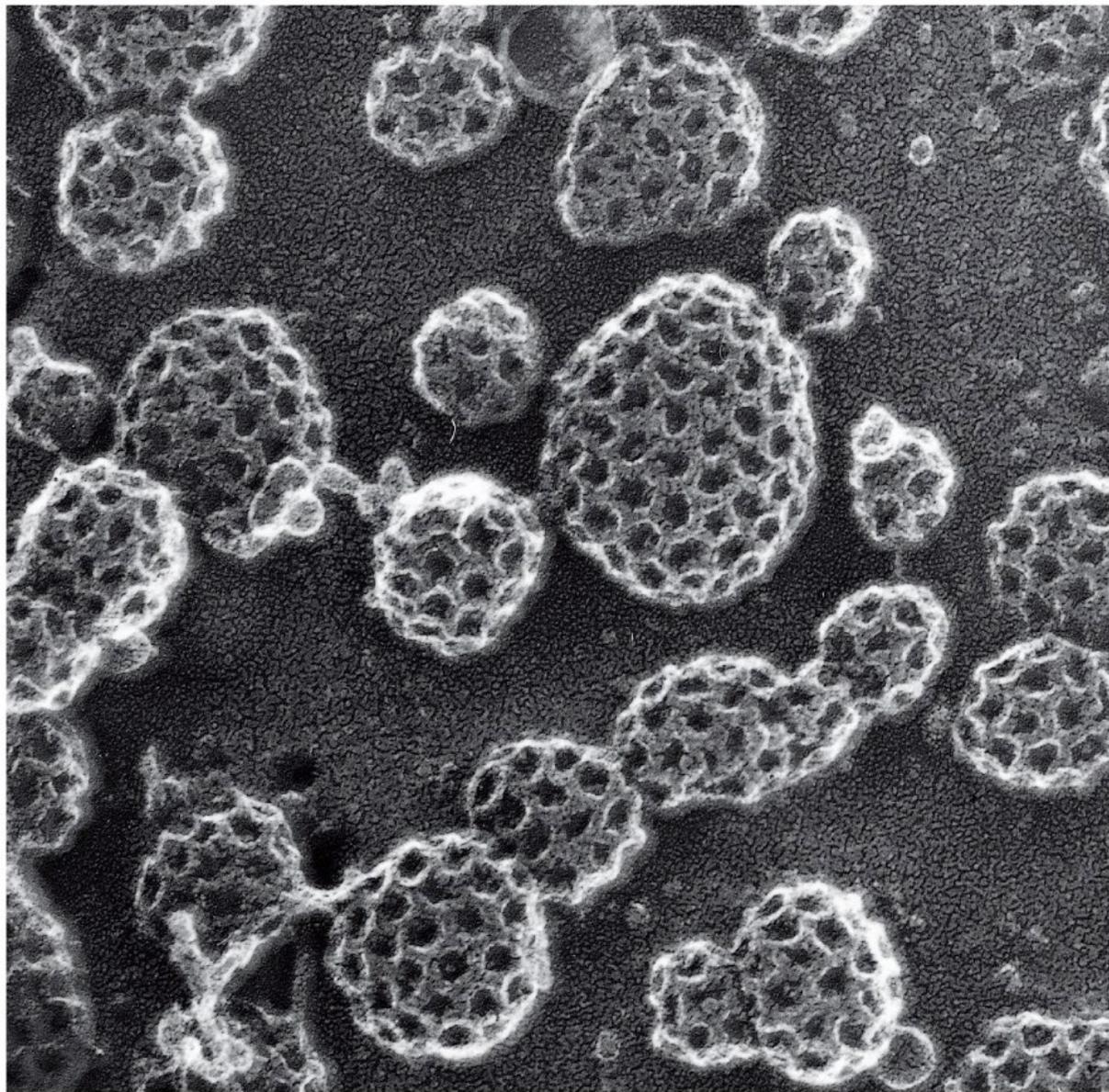
Chaque molécule de clathrine est formée de

- 3 chaînes lourdes
- 3 chaînes légères

Structure de la couverture de clathrine



Couverture de clathrine composée de 36 triskélions organisés en un réseau de 12 pentagones et de 6 hexagones (couleurs = chaînes lourdes à gauche et chaînes légères à droite)



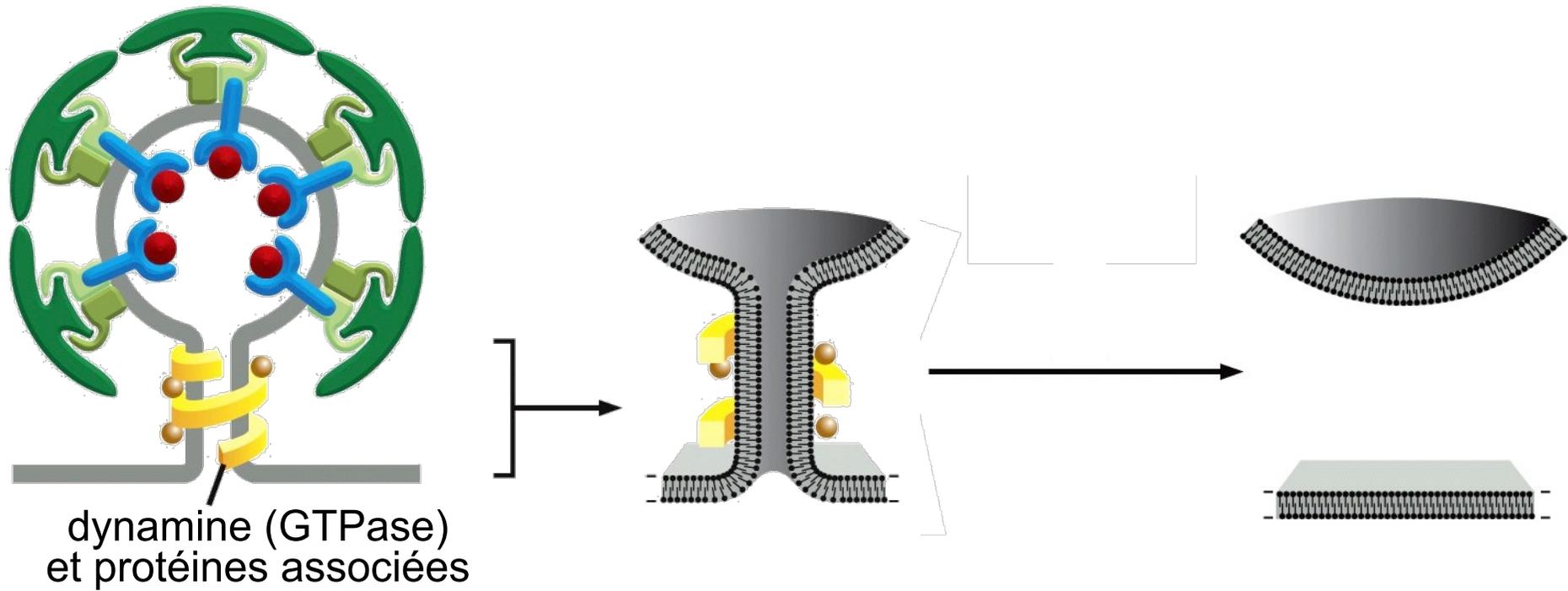
0,2 μm

Vésicules recouvertes de clathrine (cryofracture au ME)

Mécanisme de transport des cargos

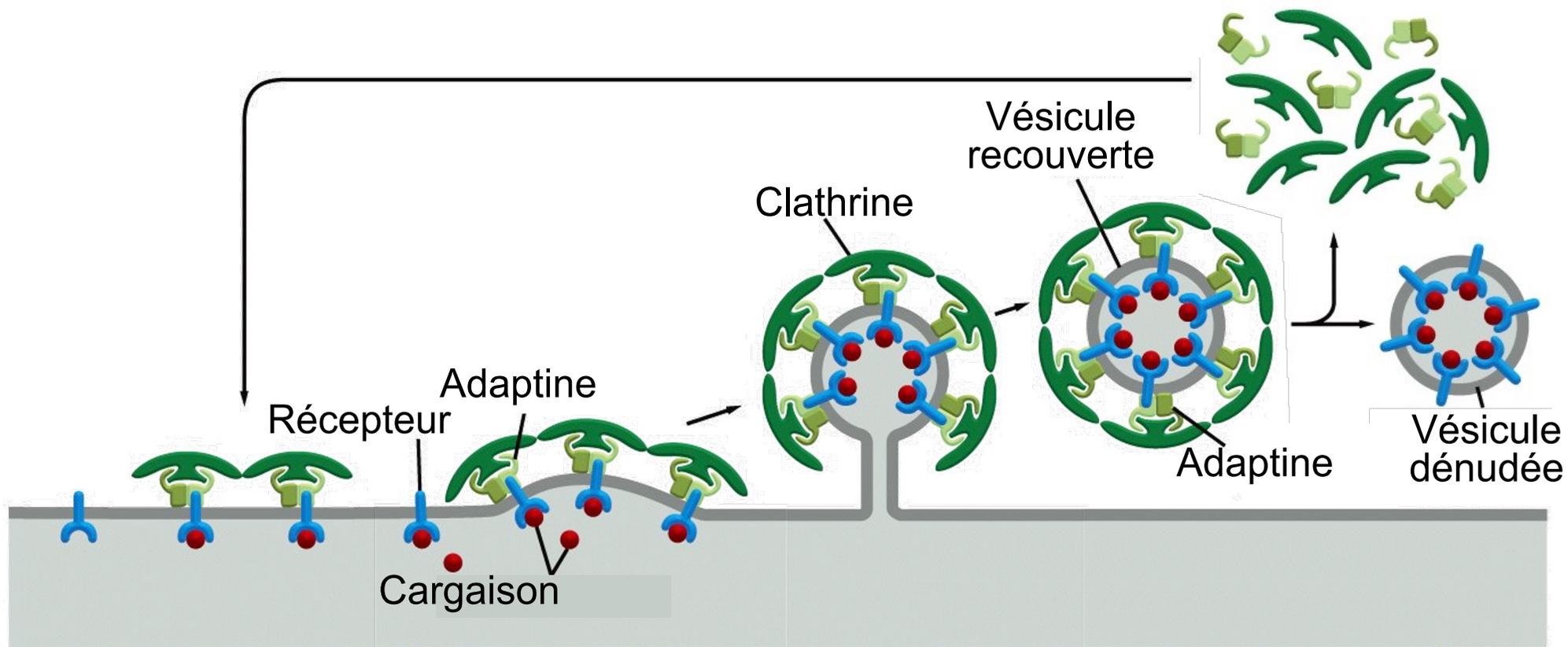
Exemple des vésicules recouverte de clathrine

- Clathrine soluble dans cytoplasme
- protéine membranaire cible reconnue par 1 adaptine, qui recrute la clathrine
- déformation de la membrane
- détachement de la vésicule (pincement grâce à la dynamine)
- perte du manteau



Rôle de la dynamine dans le pincement de la membrane des vésicules recouvertes de clathrine

Désassemblage par une protéine chaperon (hsp70)



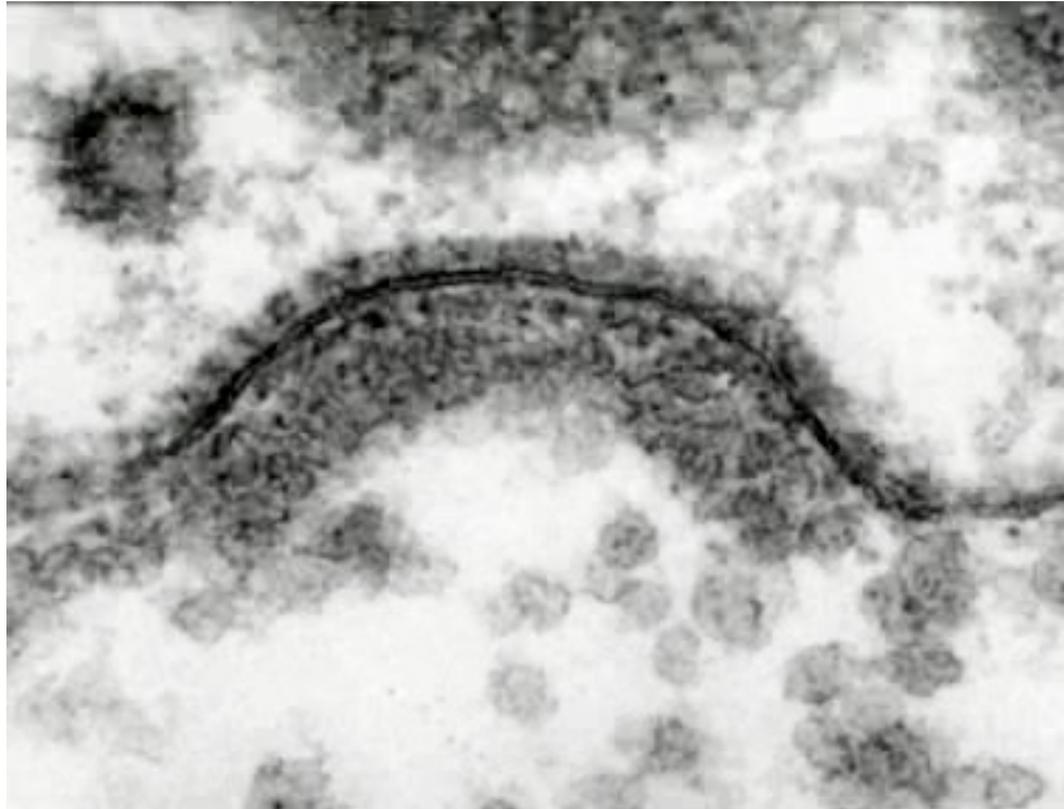
Assemblage de la couverture et sélection de la cargaison

Formation du bourgeon

Formation de la vésicule

Désassemblage de la couverture

Assemblage et désassemblage de la couverture de clathrine



Assemblage spontané des molécules de clathrine en cage polyhédrique
Association des têtes globulaires aux molécules à transporter via des adaptines
Interaction des molécules de clathrine entre elles via les chaînes légères

Mécanisme de transport des cargos

- **Séquences cibles** portées par les cargos (et/ou leur récepteur)
- Signaux apparents sur face cytoplasmique, directement pour protéines transmembranaires, indirectement par l'intermédiaire d'un récepteur transmembranaire, pour les protéines luminales
- **Bourgeonnement** et émission de **vésicules couvertes** (coated) :
 - **clathrine**
 - **COP1**, **COP2**
- **Transport** des vésicules grâce aux moteurs **kinésines/dynéines** le long des microtubules
- **Adressage**
couple protéines **Rab** (GTPase)(sur la vésicule) + **facteur d'attachement**
- **Fusion** des vésicules sur l'organelle cible
couple **v-SNARE + t-SNARE**

Protéines Rab :

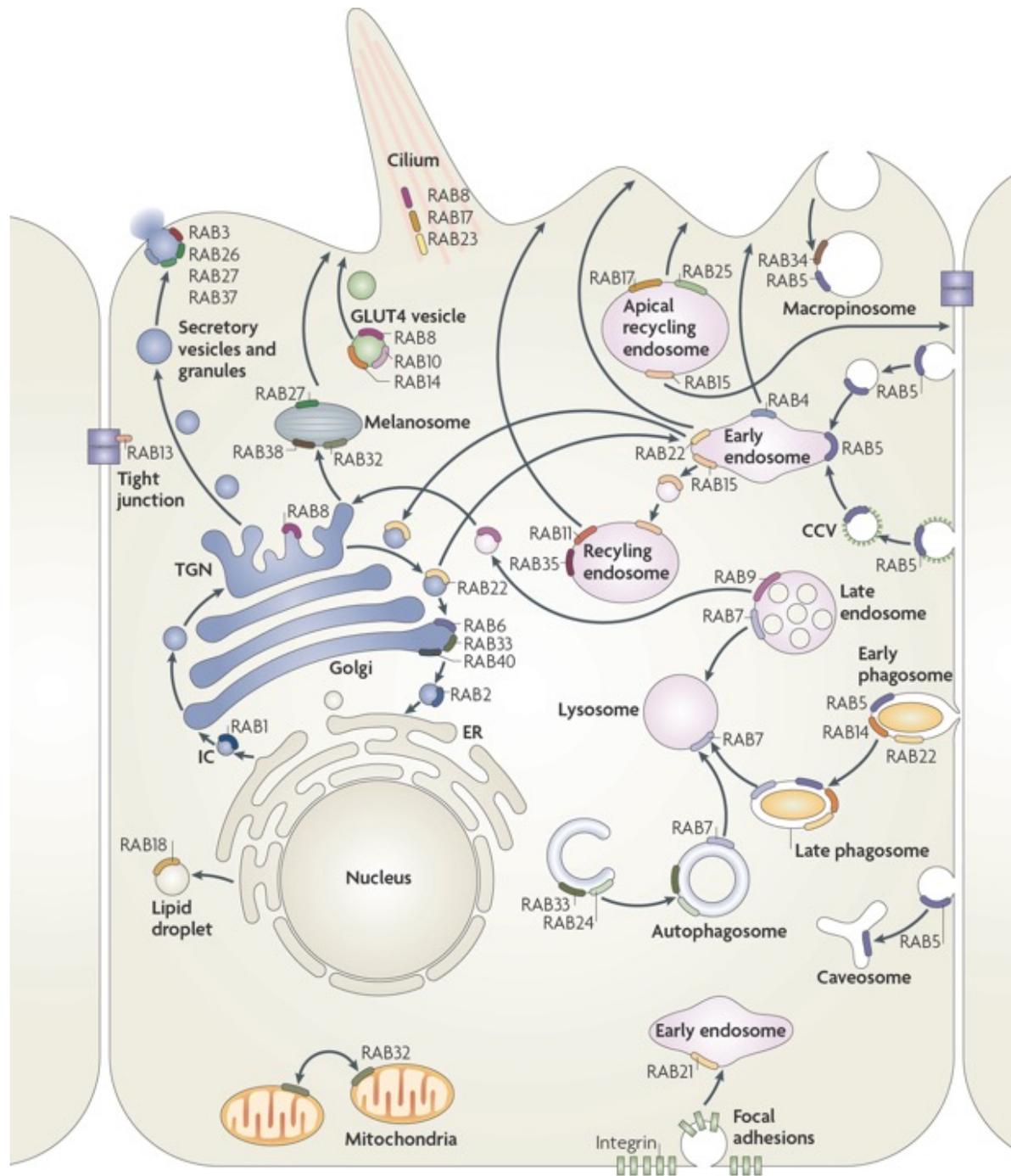
- grande famille de protéines monomériques à activité GTPase (appartenant à la super-famille Ras),
- Associées à la membrane plasmique ou à un type particulier d'organite ou de vésicule (interaction membranaire par ancre prényl, lorsque la protéine est sous forme GTP),
- impliquée dans la spécificité de l'arrimage des vésicules, par interaction avec des facteurs d'attachement eux-même présents sur un type de mb cible

Plus de 60 protéines Rab actuellement décrites et répertoriées

Ex:

RAB1	Golgi complex
RAB2A	ER, cis-Golgi network
RAB3A	secretory and synaptic vesicles
RAB4A	recycling endosomes
RAB5A	clathrin-coated vesicles, plasma membranes
RAB5C	early endosomes
RAB6A	Golgi and trans-Golgi network
RAB7	late endosomes, vacuoles
RAB8A	basolateral secretory vesicles
RAB9A	late endosome, trans-golgi network

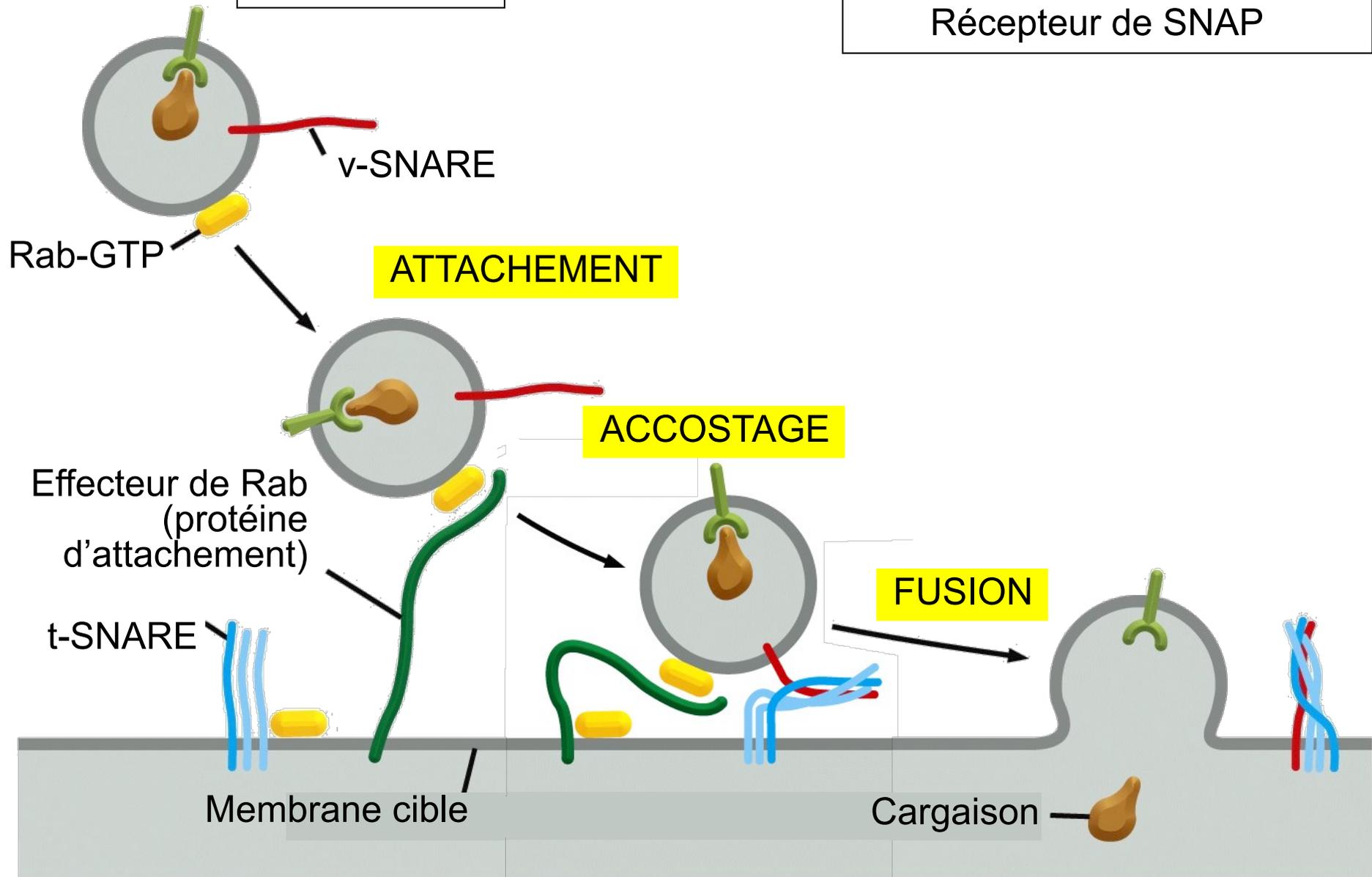
....



Plus de 60 protéines Rab actuellement décrites et répertoriées

v = « vesicle »

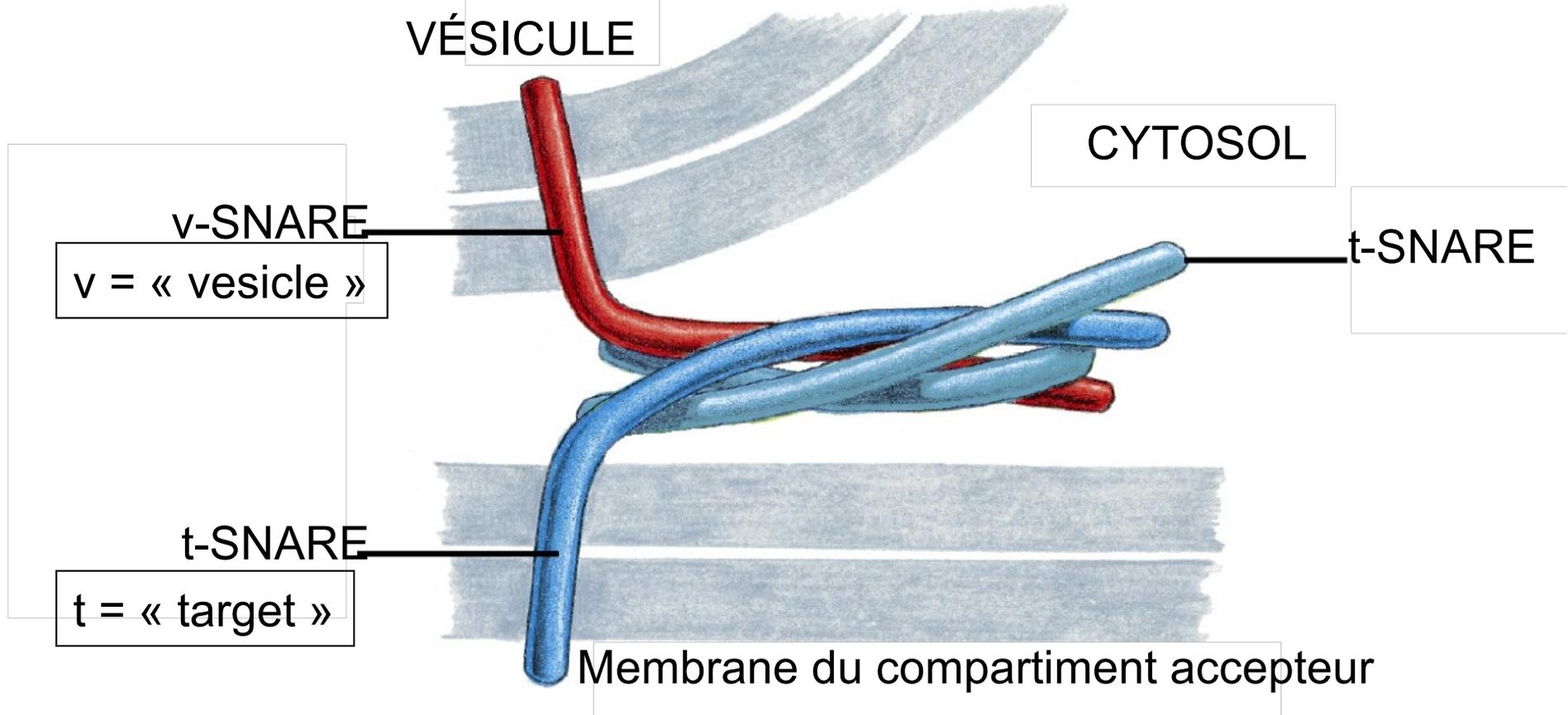
SNARE = « **SNAP Receptor** »
Récepteur de SNAP



t = « target »

Attachement d'une vésicule à la membrane cible

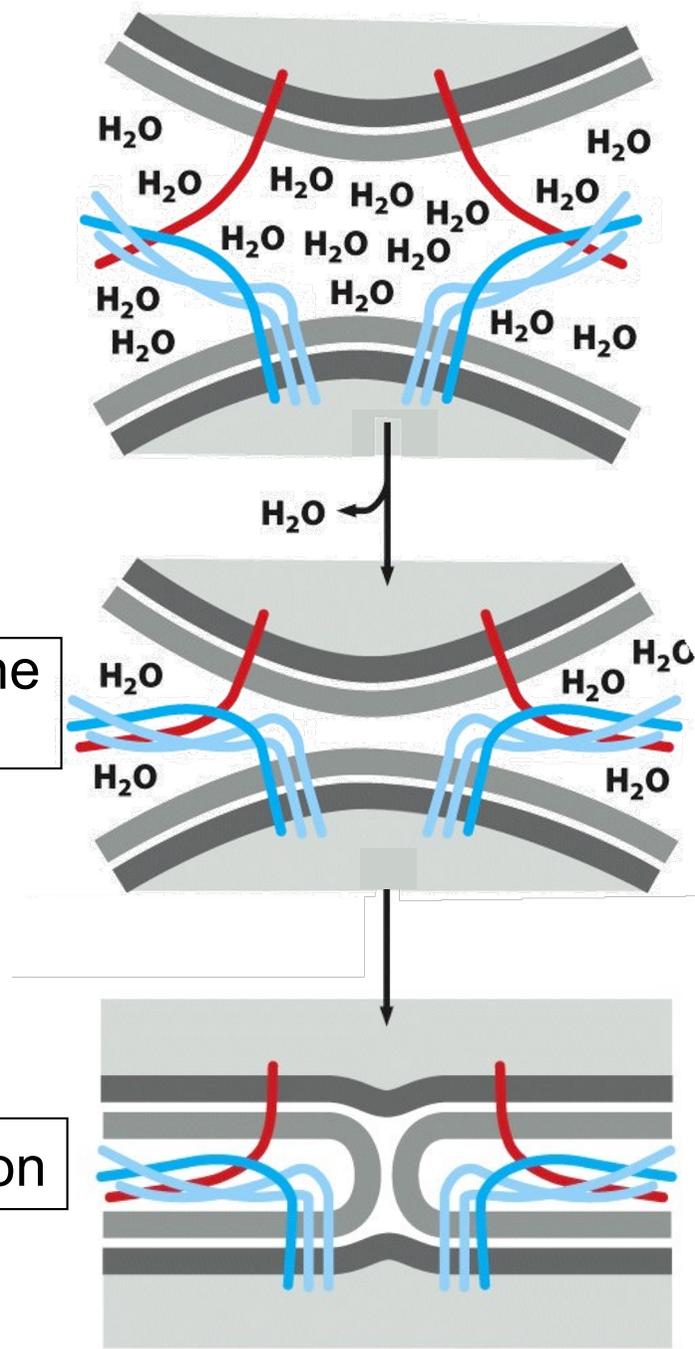
SNARE = « **SNAP Receptor** »
Récepteur de SNAP
(Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor
Attachment Protein)



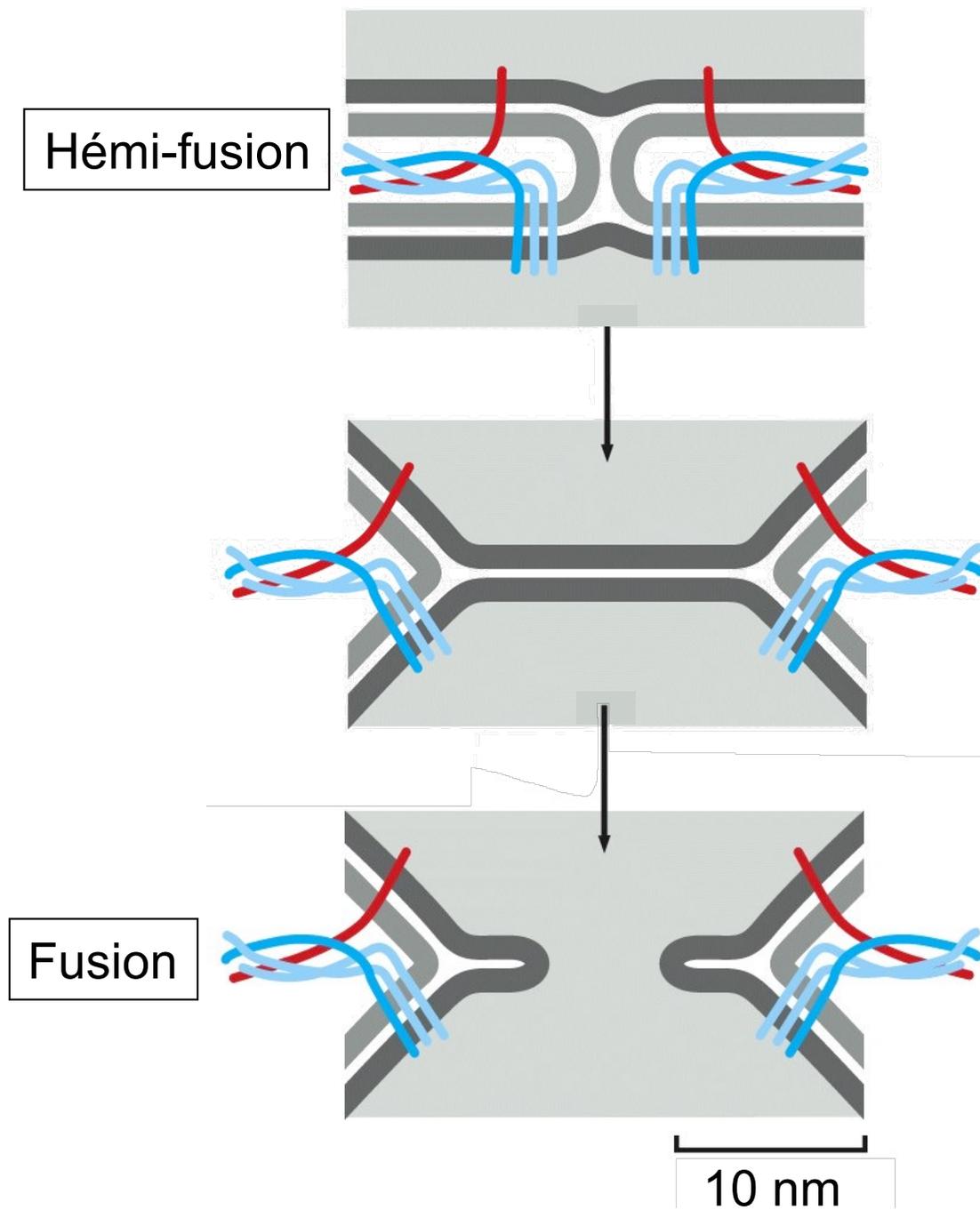
Plus de 35 protéines SNARE différentes dans une cellule animale

**Modalités d'appariement des protéines SNARE
dans l'accostage et la fusion des vésicules synaptiques**

Formation d'une zone de connexion

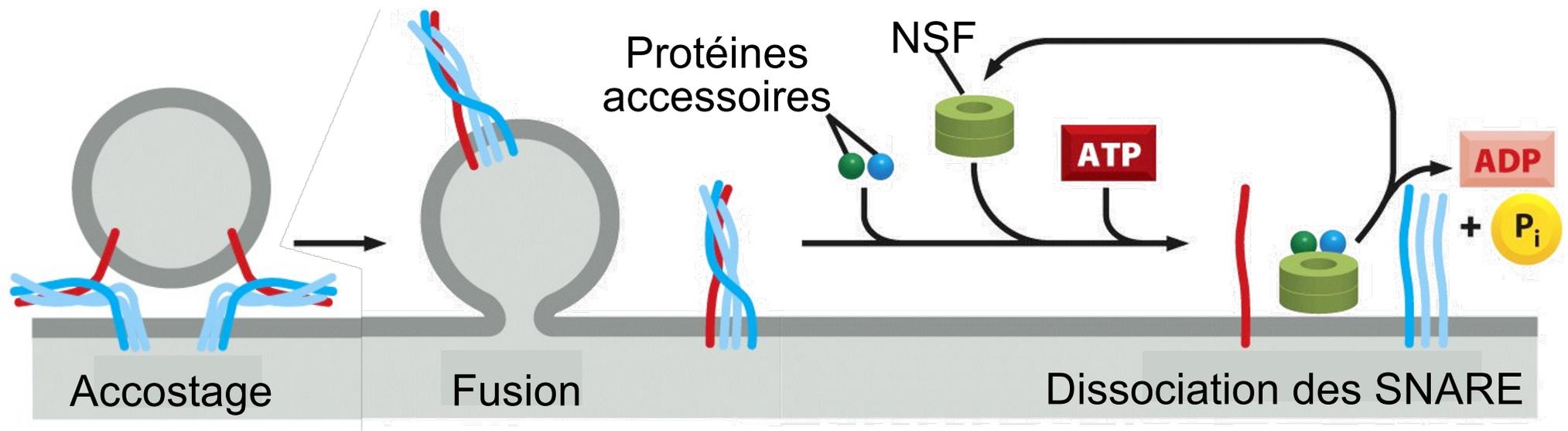


Modèle de fusion des membranes grâce aux protéines SNARE



Modèle de fusion des membranes grâce aux protéines SNARE

NSF = « **N**-ethylmaleimide-**S**ensitive **F**usion » protein
ou
« **N**-ethylmaleimide-**S**ensitive **F**actor » protein
protéine de fusion sensible au N-éthylmaléimide



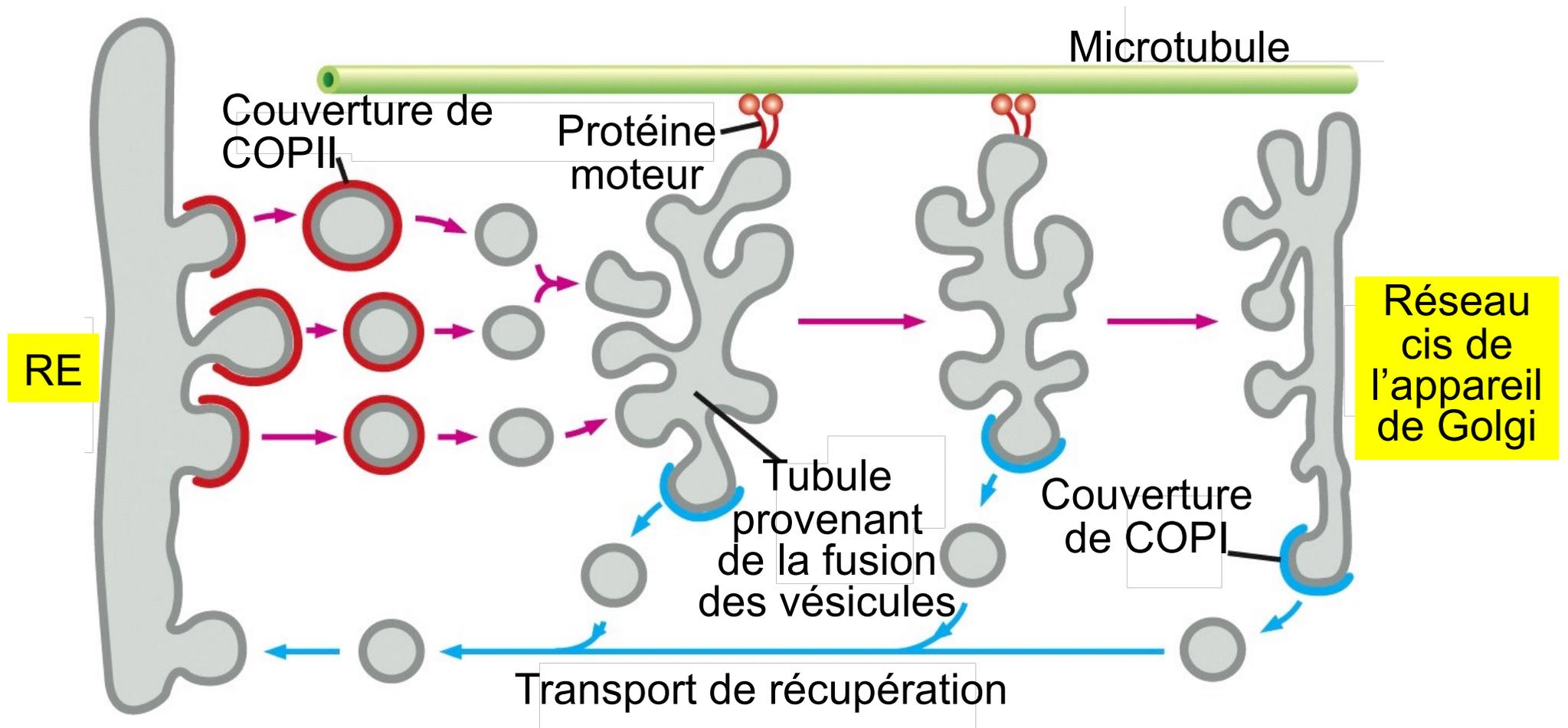
**À la fin d'un cycle de fusion des membranes
dissociation par NSF des protéines SNARE appariées**

Trafic vésiculaire vers le Golgi

- **Rétention des protéines résidentes du RE**

Tri au niveau d'un compartiment intermédiaire :

ERGIC (ER-Golgi Intermediate Compartment)



Le compartiment d'agrégats de vésicules et tubules (VTC) ou ERGIC (ER-Golgi intermediate compartment) joue un rôle essentiel dans le tri des protéines qui quittent le RE granulaire

Trafic vésiculaire du RE vers le Golgi

- **Rétention des protéines résidentes du RE**

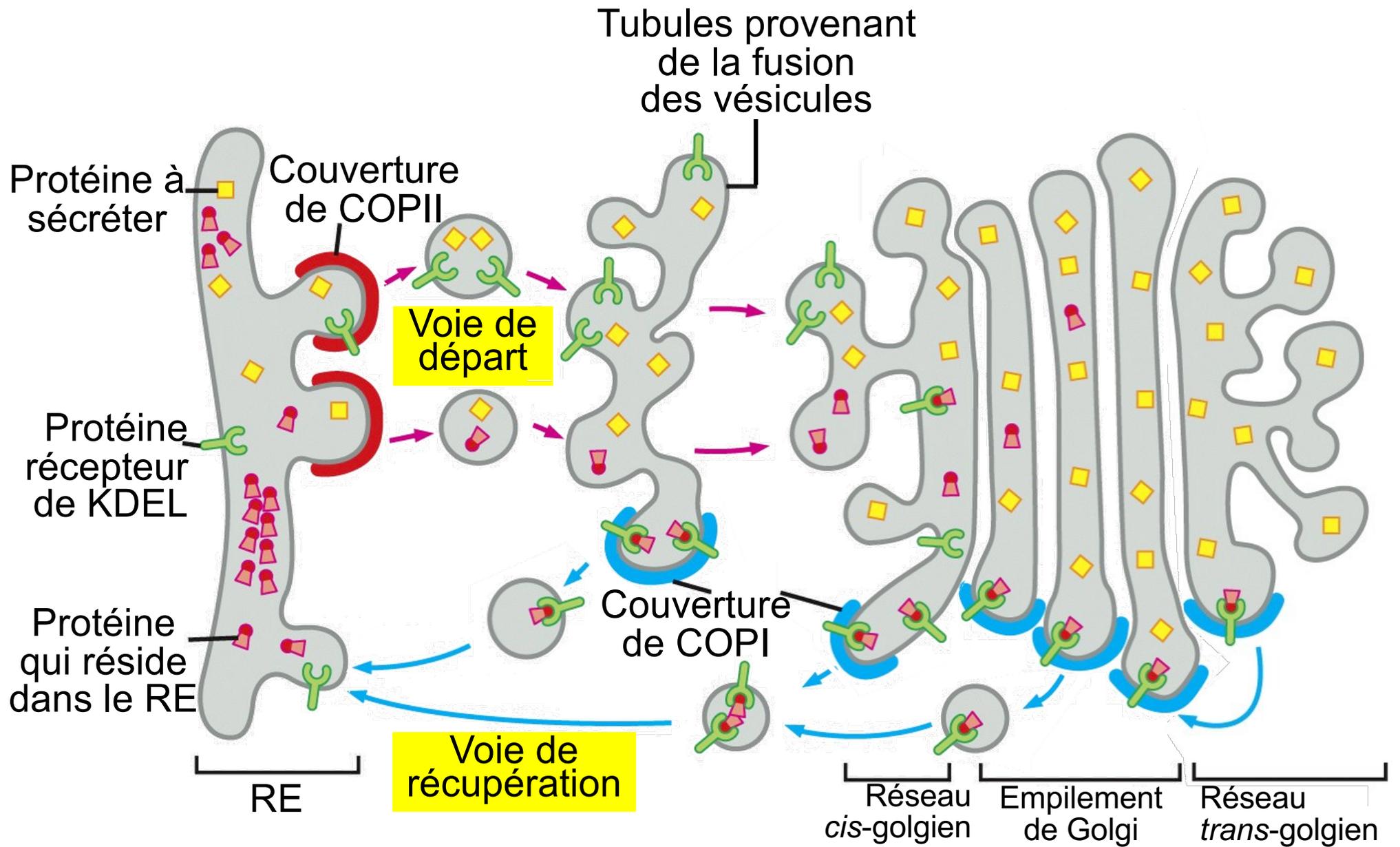
Tri au niveau d'un compartiment intermédiaire :

ERGIC (ER-Golgi Intermediate Compartment)

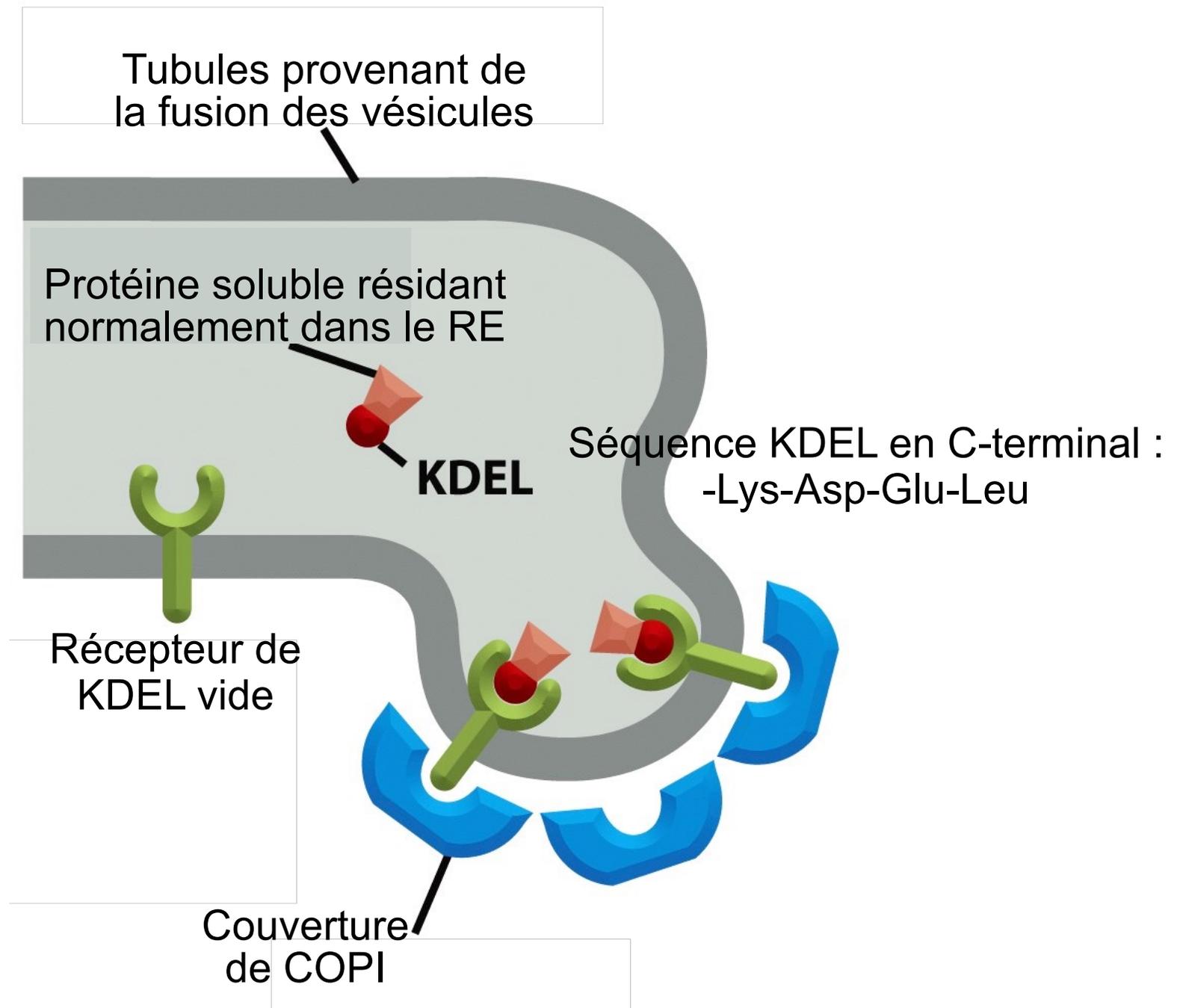
Retour des protéines du RE:

- protéines luminales porteuses de séquence **KDEL** (-Lys-Asp-Glu-Leu-) en C-term (séquence de rétention)
- protéines membranaires porteuses d'une séquence **KKXX** sur leur partie cytoplasmique (notamment le récepteur à KDEL), séquence qui interagit directement avec les sous-unités de COPI

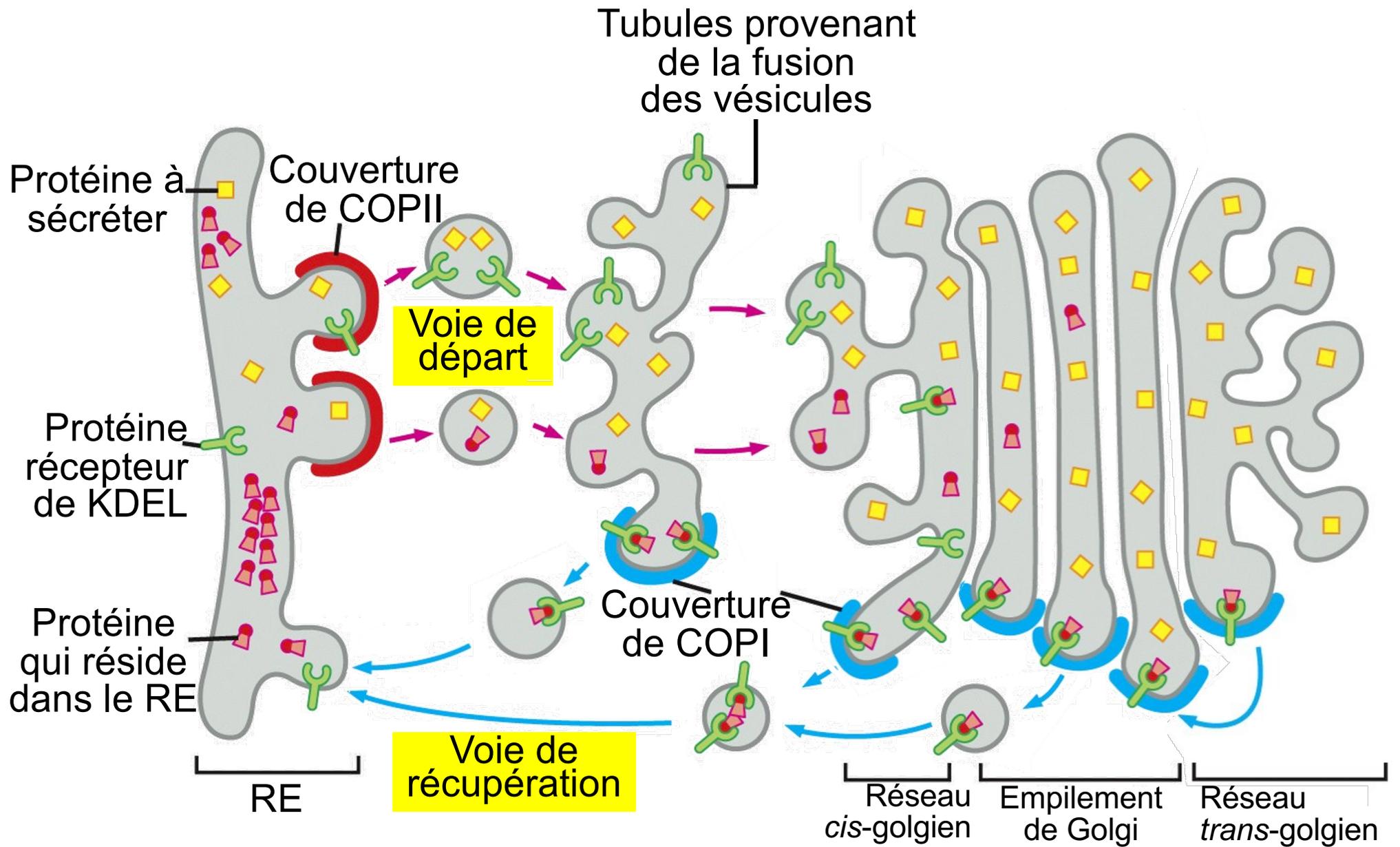
Retro-transport par vésicules également



Récupération par le RE des protéines solubles qui en sont parties



**Bourgeonnement d'une vésicule destinée au retour dans le RE
des protéines du RE qui en sont parties**



Récupération par le RE des protéines solubles qui en sont parties

Points à retenir

Principes du transport vésiculaire :

- Séquences peptidiques cibles
- Vésicules recouvertes
- Complexes d'adressage et d'accostage
- Rôle des protéines Rab
- Rôle des SNARE dans la fusion vésiculaire
- Principe de la rétention dans le compartiment d'origine

TRANSPORT DES PROTÉINES DANS L'APPAREIL DE GOLGI

Golgi (appareil de Golgi ou complexe de Golgi) :

- organite dans lequel les protéines et les lipides, en provenance du réticulum endoplasmique, sont modifiés et triés.
- site de synthèse des glycosaminoglycanes de la matrice extracellulaire des cellules animales et de nombreux polysaccharides de la paroi de la cellule des plantes.

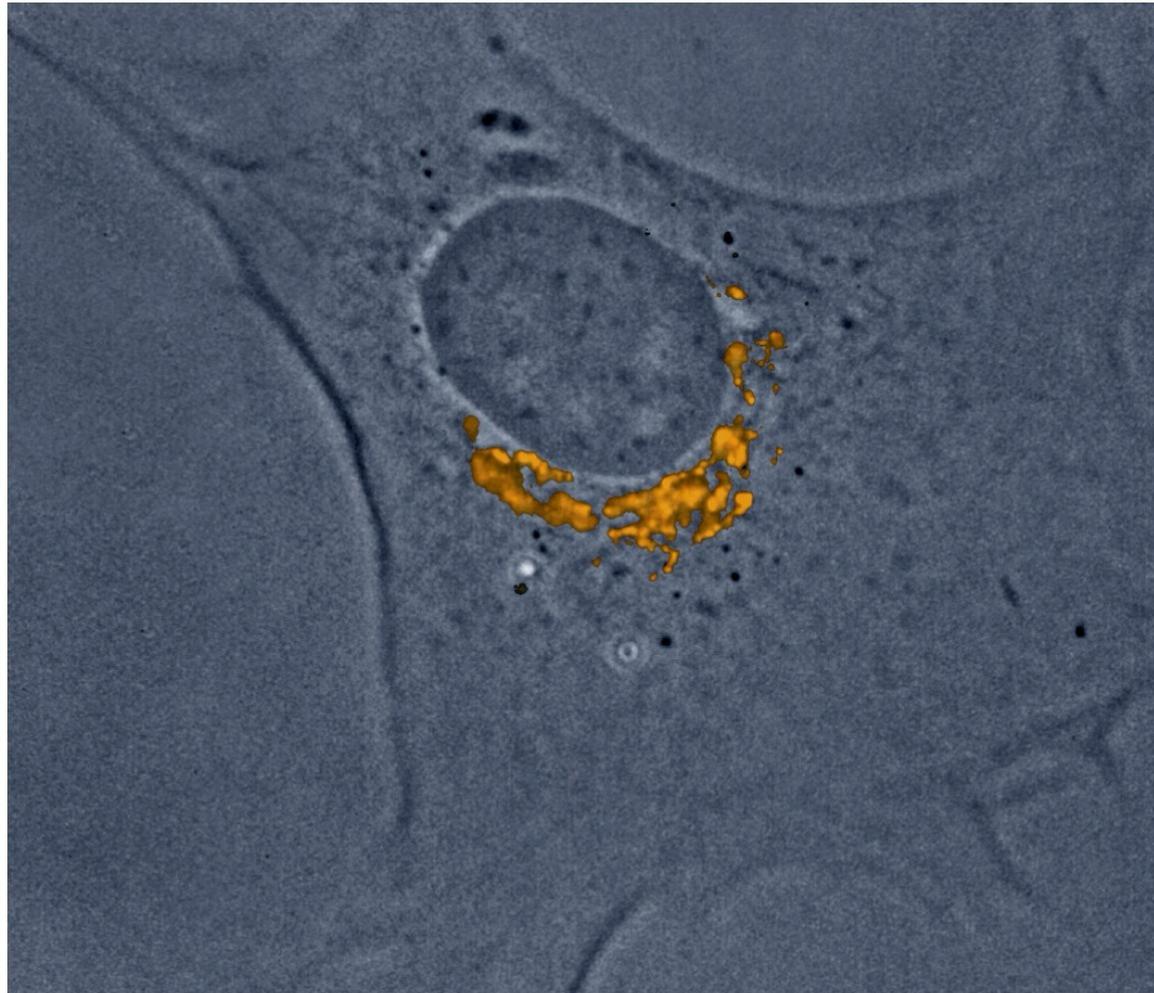


Camillo Golgi
1843-1926



Santiago Ramon y Cajal
1852-1934

Prix Nobel de Médecine ou de Physiologie en 1906
« en reconnaissance de leur travail sur la structure du système nerveux ».

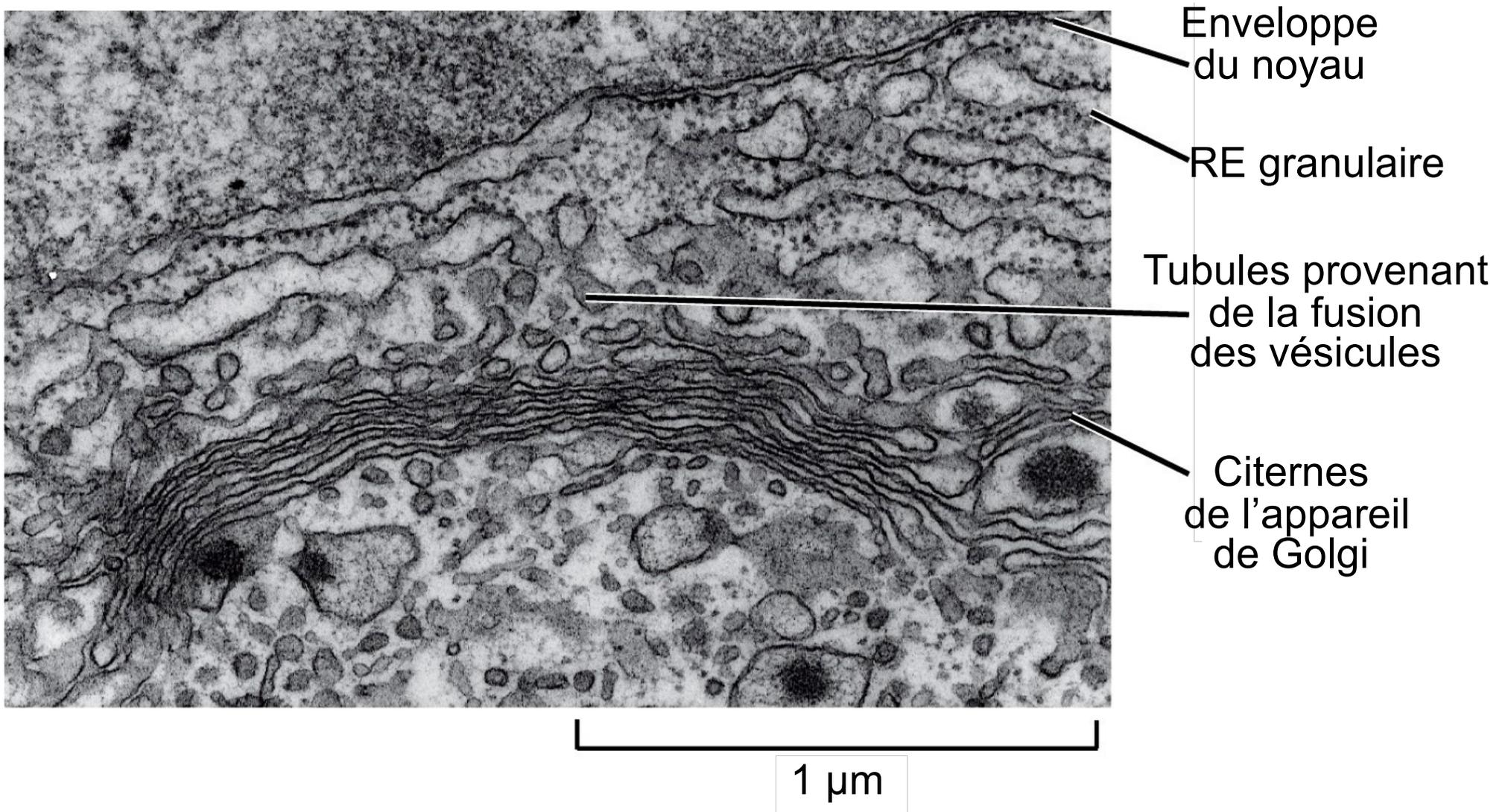


10 μm

Fibroblaste en culture

(IF indirecte avec lumière polarisée et un anticorps dirigé contre une protéine qui réside dans l'appareil de Golgi)

L'appareil de Golgi vu en microscopie optique



L'appareil de Golgi d'une cellule d'un animal (Microscopie électronique)

4 à 6 citernes empilées en moyenne jusqu'à plus de 60 chez les flagellés

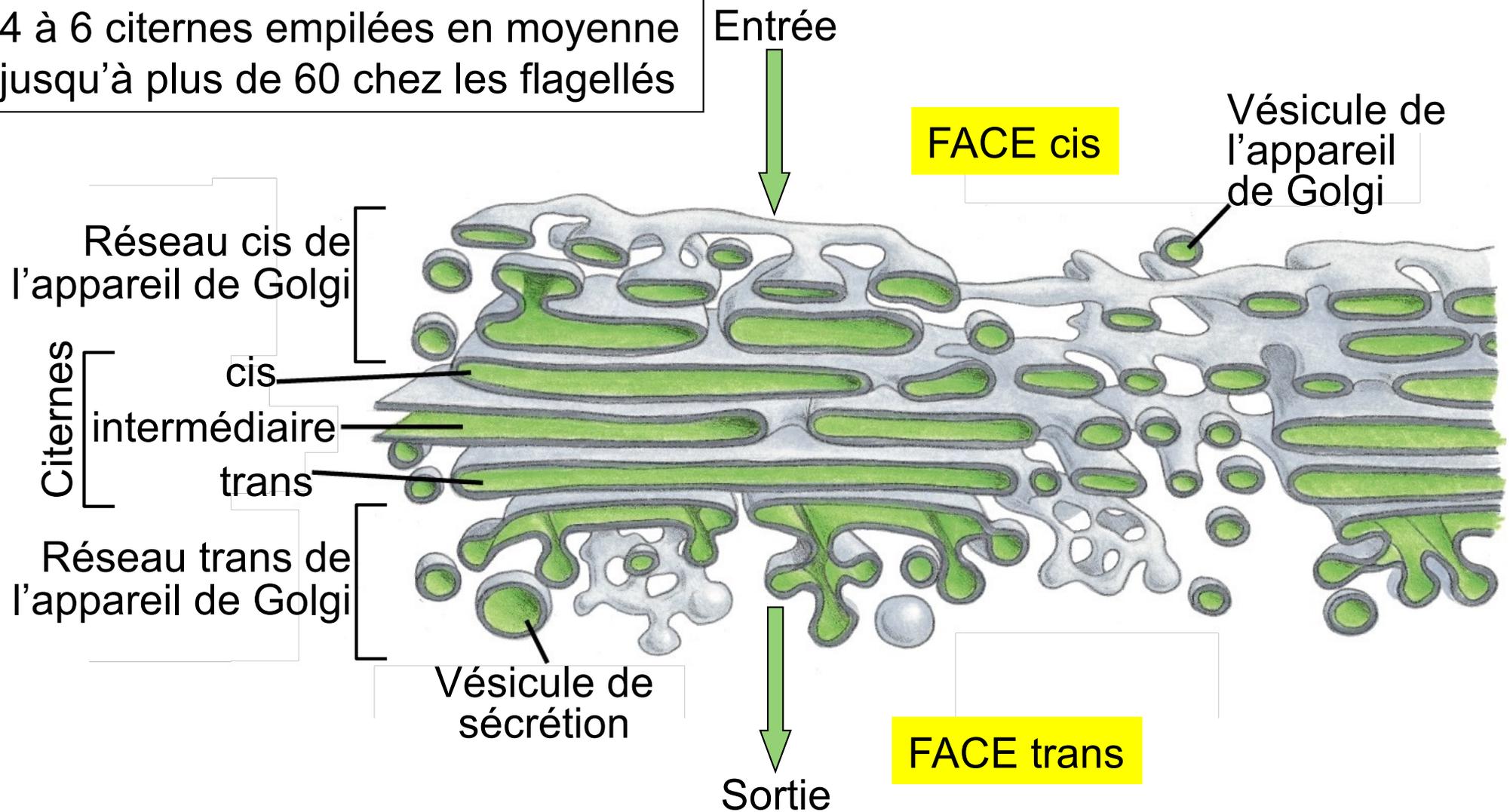
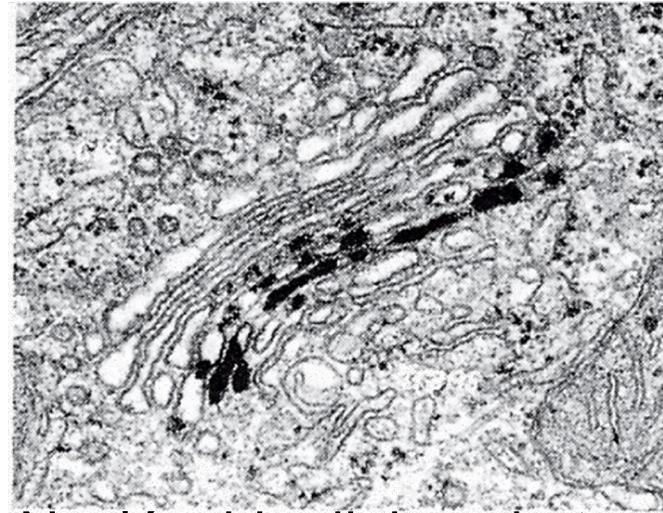
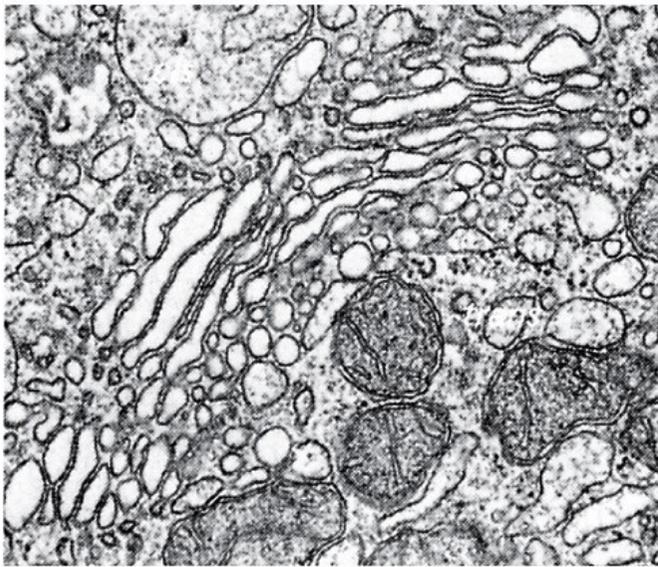


Schéma de l'appareil de Golgi

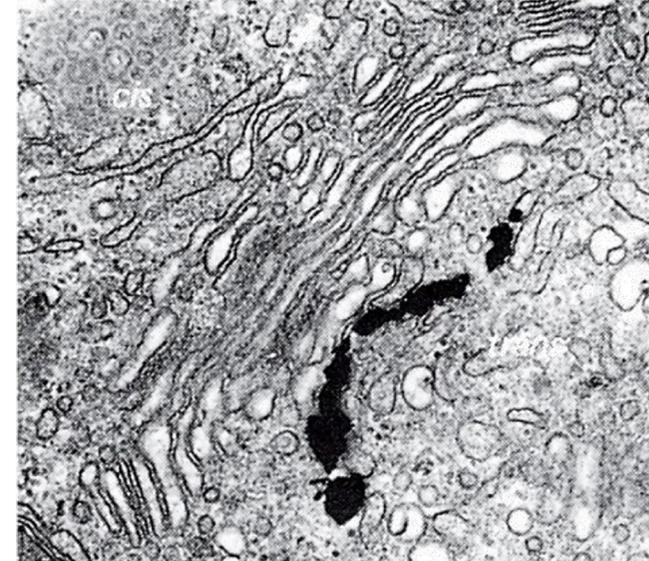
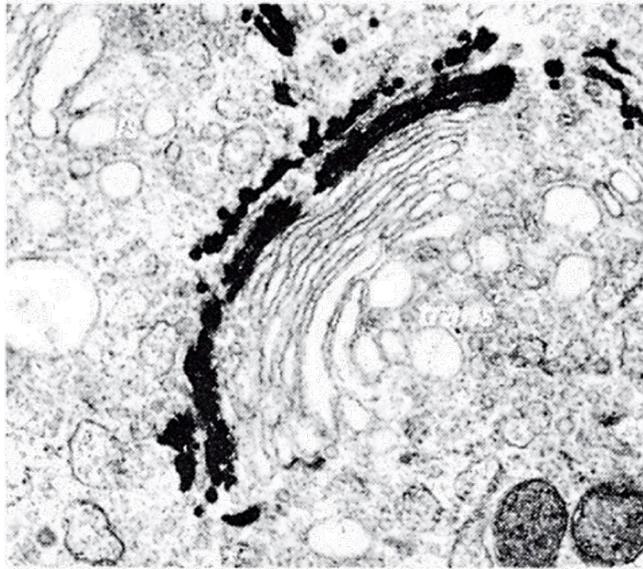
Golgi (appareil de Golgi ou complexe de Golgi) : organite des cellules eucaryotes dans lequel les protéines et les lipides, en provenance du réticulum endoplasmique, sont modifiés et triés. Il est le site de synthèse des glycosaminoglycanes de la matrice extracellulaire des cellules animales et de nombreux polysaccharides de la paroi de la cellule des plantes.

Témoin
non coloré



Nucléoside diphosphatase
dans les citernes *trans*

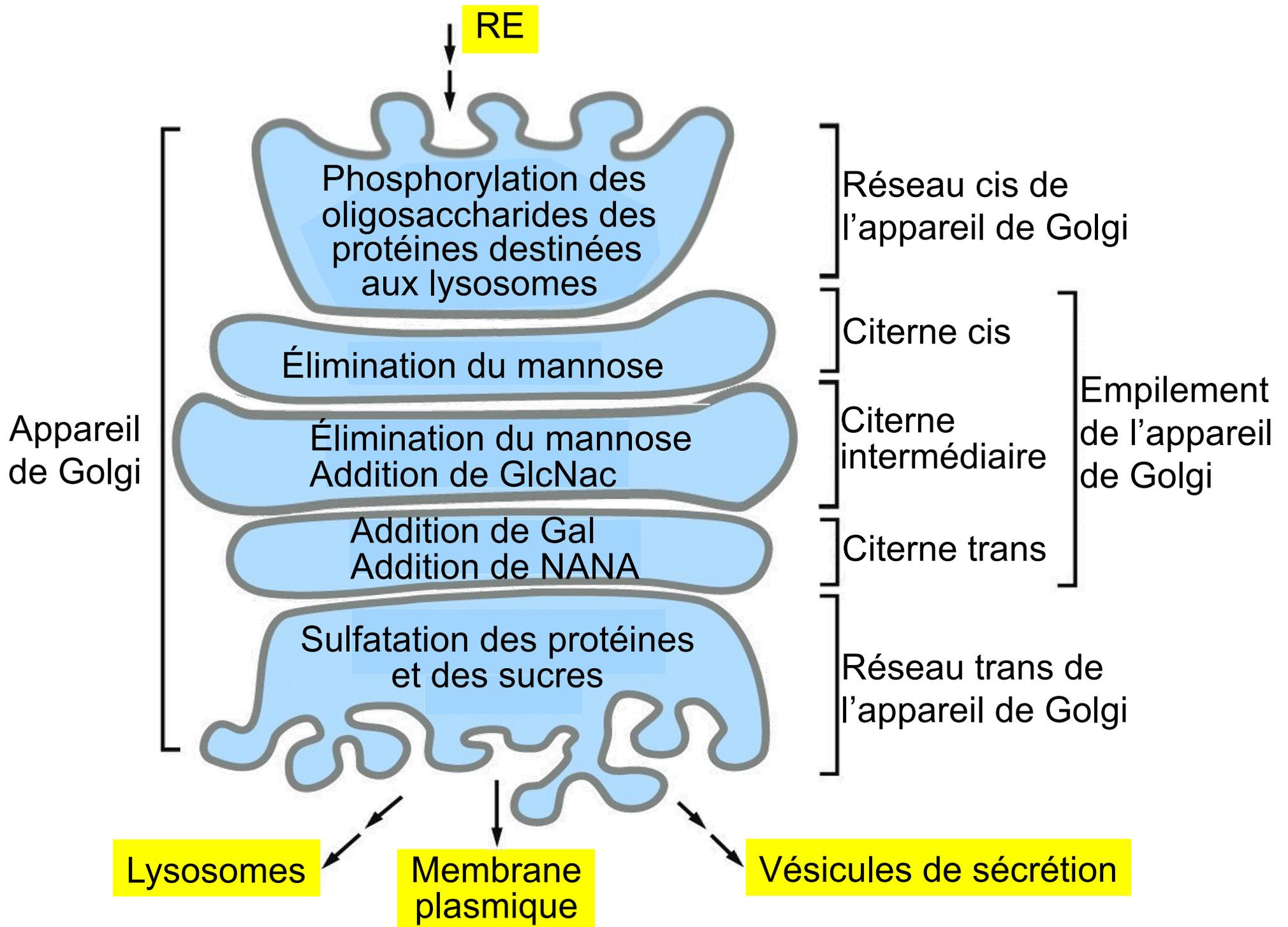
Coloration
à l'osmium,
réduit dans
les citernes
de la partie
cis



Phosphatase
dans le
réseau *trans*

1 μ m

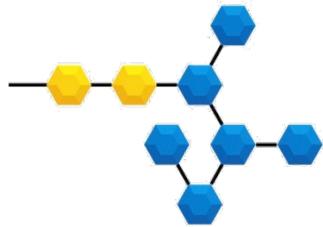
**Démonstration de la compartimentation de l'appareil de Golgi
par coloration histochimique spécifique (ME)**



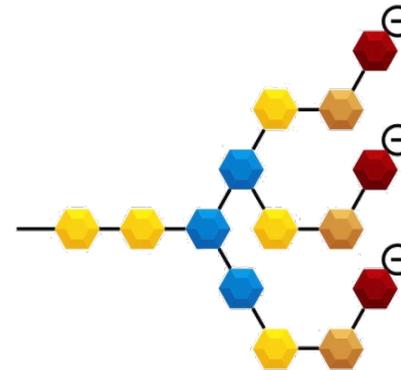
Compartimentation fonctionnelle de l'appareil de Golgi

Modification des chaînes N-oligosaccharidiques

- suppression de mannoses , ajout de sucres divers → oligosaccharides complexes
- ou peu de modifications → oligosaccharides à contenu élevé en mannose



oligosaccharide à contenu élevé en mannose



oligosaccharide complexe

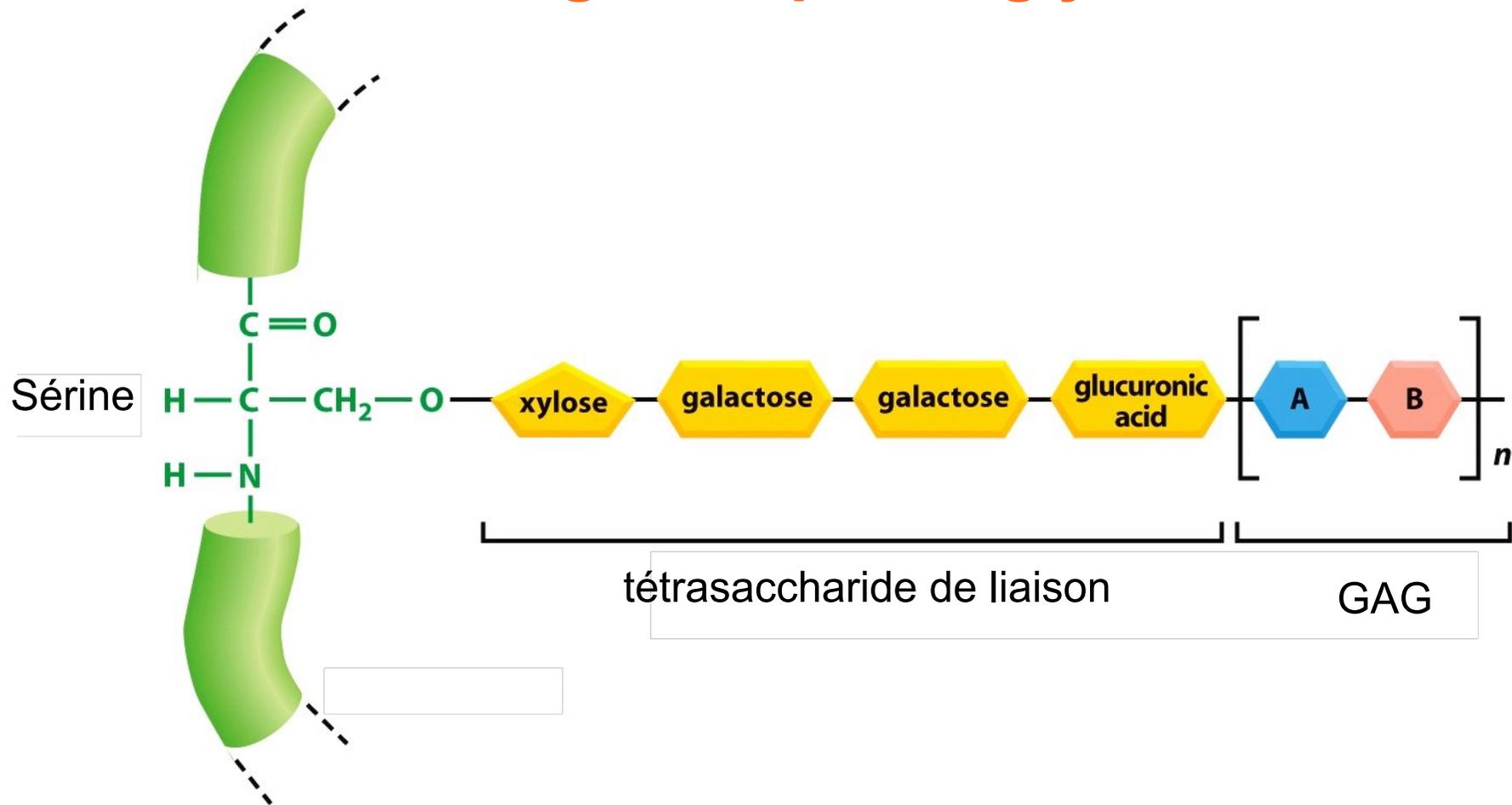
- = N-acétylglucosamine (GlcNAc)
- = mannose (Man)
- = galactose (Gal)
- ⁻ = acide N-acétylneuraminique (NANA)

O-glycosylation

Construction d'oligosaccharides O-liés :

- sur des groupements hydroxyles (-OH) des résidus sérine ou thréonine
 - Catalysée par une série de glycosyl-transférases (membranaires),
 - qui transfèrent les sucres **l'un après l'autre**
 - à partir de nucléotides sucrés présents dans la lumière
- oligosaccharides plus petits (5-6 résidus)
- sauf cas des **protéoglycanes**

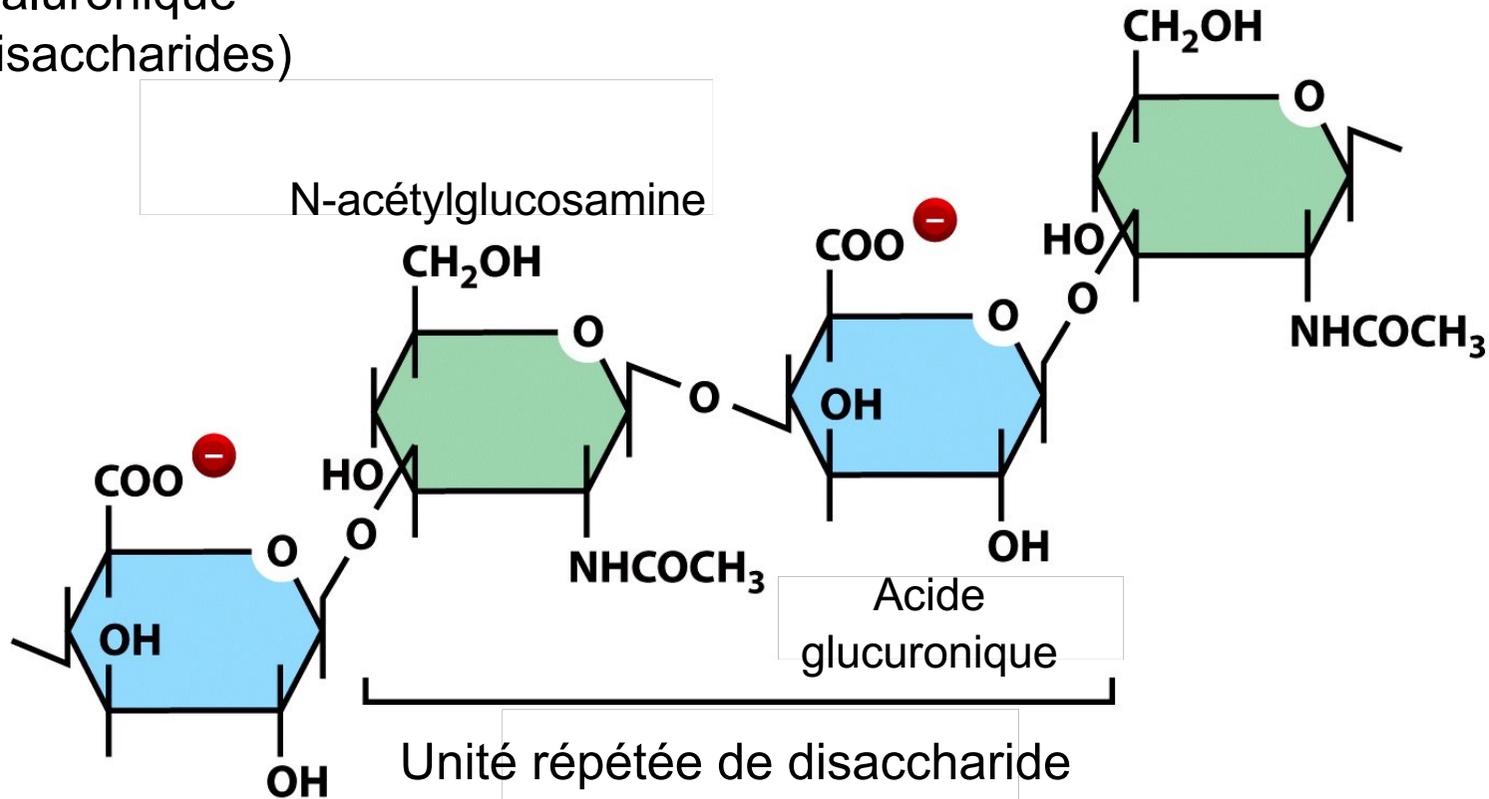
Assemblage des protéoglycane



- par polymérisation de chaînes de glycosaminoglycane (GAG)
- liés au groupement hydroxyl d'une sérine via un xylose
- pour former l'essentiel des protéines de la matrice extra-cellulaire**

Protéoglycane : molécule qui consiste en un ou plusieurs glycosaminoglycane attachés de façon covalente à une protéine.

Acide hyaluronique
(~ 25000 disaccharides)

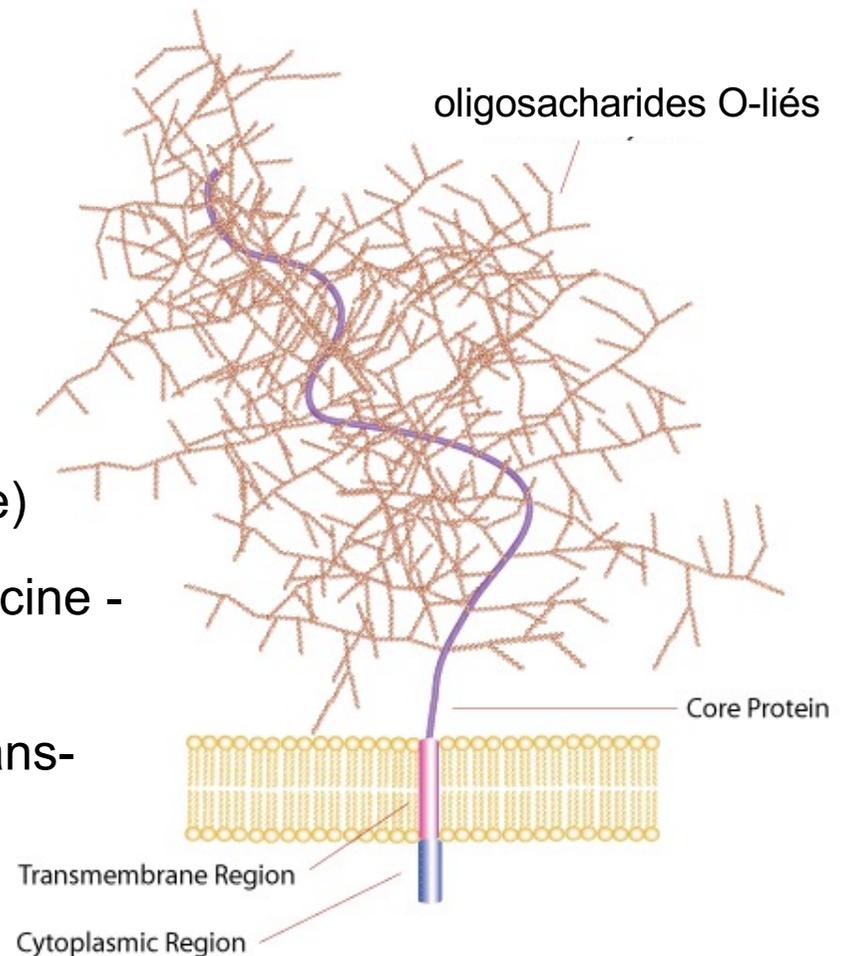


Glycosaminoglycane (GAG) : longue chaîne **linéaire** (non branchée) de polysaccharides chargés, composée de paires de sucres répétées, dont l'un est toujours un sucre aminé.

Les glycosaminoglycane sont libres ou attachés de façon covalente à la partie protéique des protéoglycane de la matrice extracellulaire. Exemple : l'héparine, l'acide hyaluronique, le sulfate de chondroïtine.

Rôles de la glycosylation

- Sites actifs des enzymes de modifications dans la lumière du Golgi → glycosylation sur cette face de la mb, donc vers l'extérieur de la cellule
- Variabilité immense des sucres liés aux protéines → rôle ?
 - pas complètement connu
 - participation au repliement des protéines (solubilisation) et au système de contrôle de qualité (cf lectines)
 - protection vis à vis de la dégradation par les protéases issues du milieu extracellulaire
 - Molécules **rigides**: rôle mécanique (cartilage)
 - Molécules **hydrophiles**: rétention d'eau (mucine -> gel (**mucus**) par cellules épithéliales)
 - **adhérence** entre cellules via des lectines transmembranaires (sélectines)



Mucines (sécrétées ou membranaires, par cellules épithéliales)

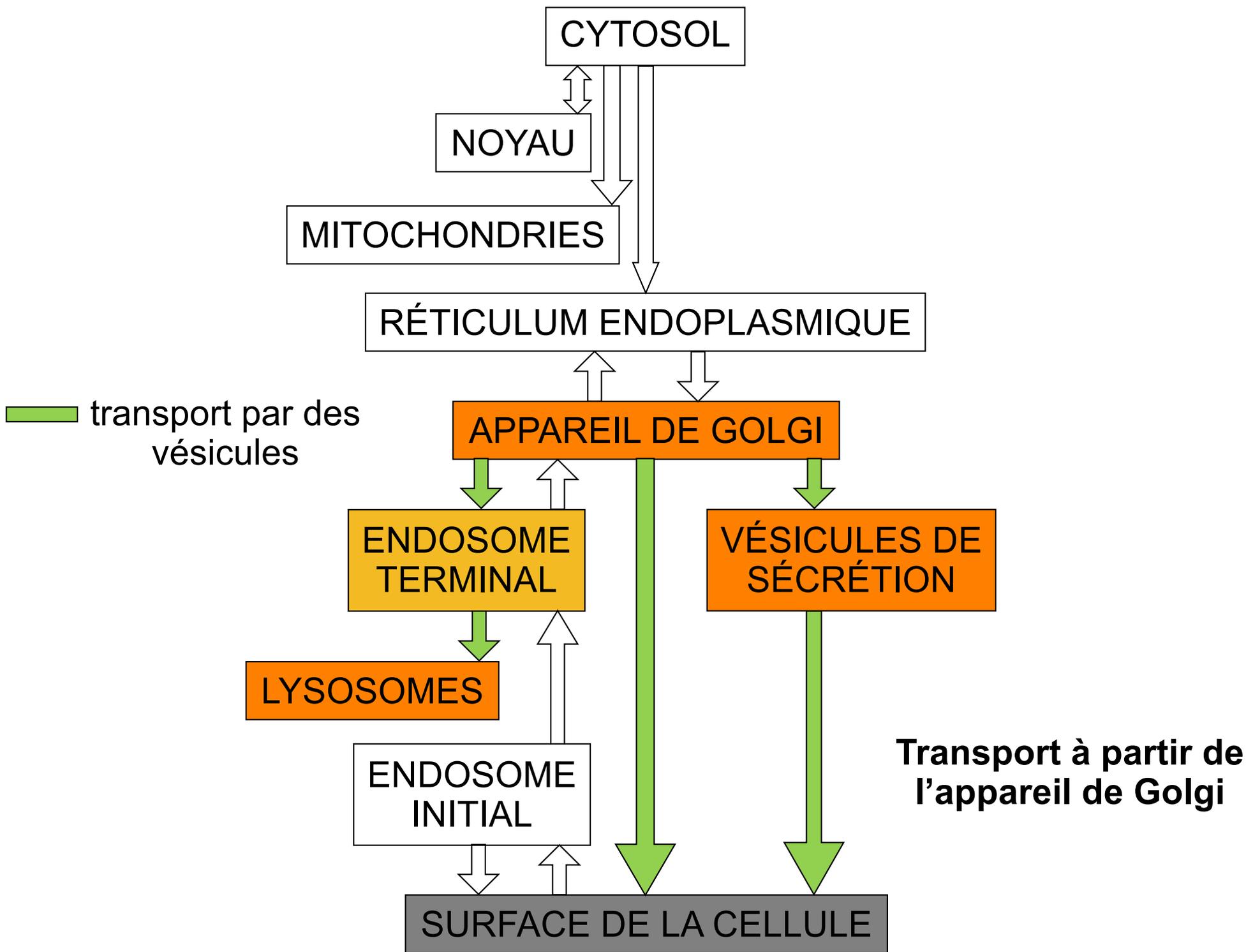
Points à retenir

- structure de l'appareil de Golgi, un organite polarisé
- fonctions principales de l'appareil de Golgi
- différences entre N-glycosylation et O-glycosylation

TRANSPORT À PARTIR DE L'APPAREIL DE GOLGI

Différentes voies possibles à partir de la face trans de l'appareil de Golgi
(=Réseau trans-golgien = TGN)

- vers la surface de la cellule : Sécrétion (**Exocytose**)
- vers les **Lysosomes**



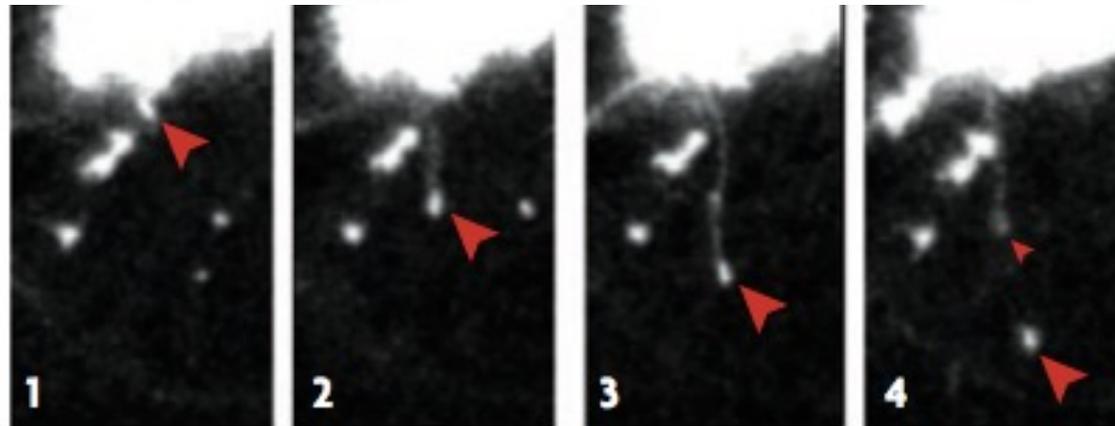
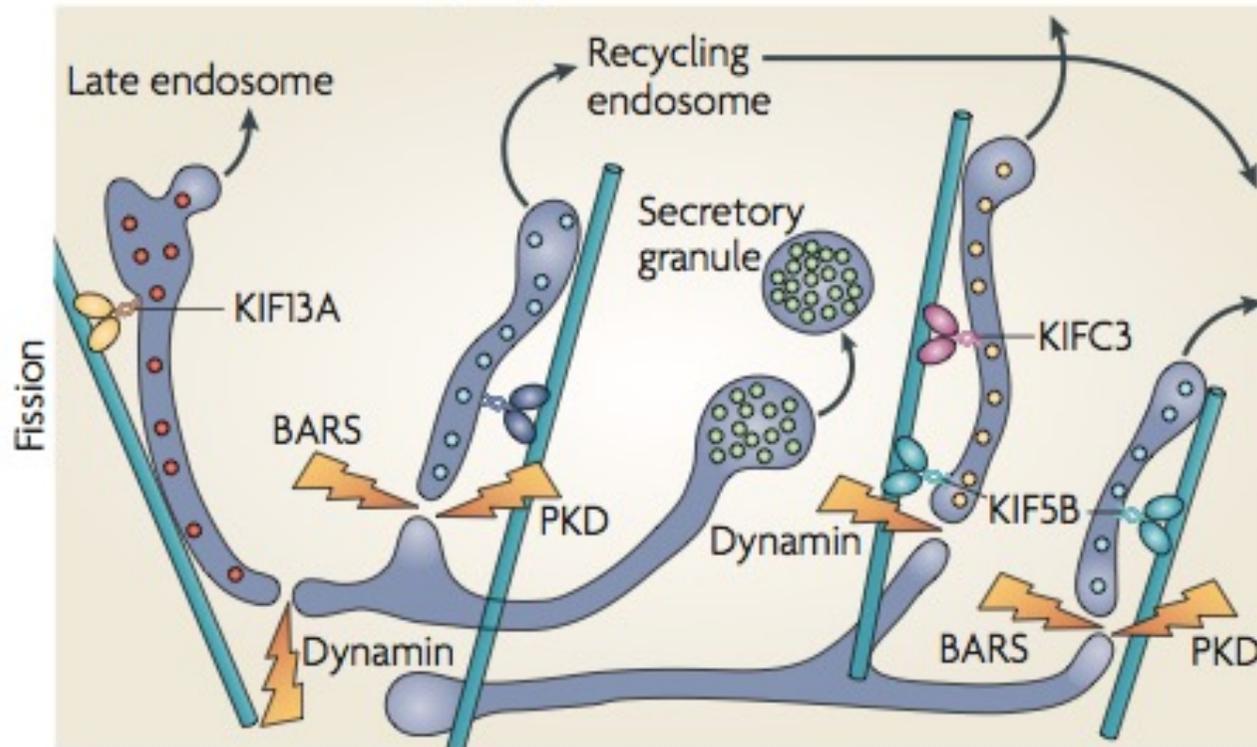


200 nm



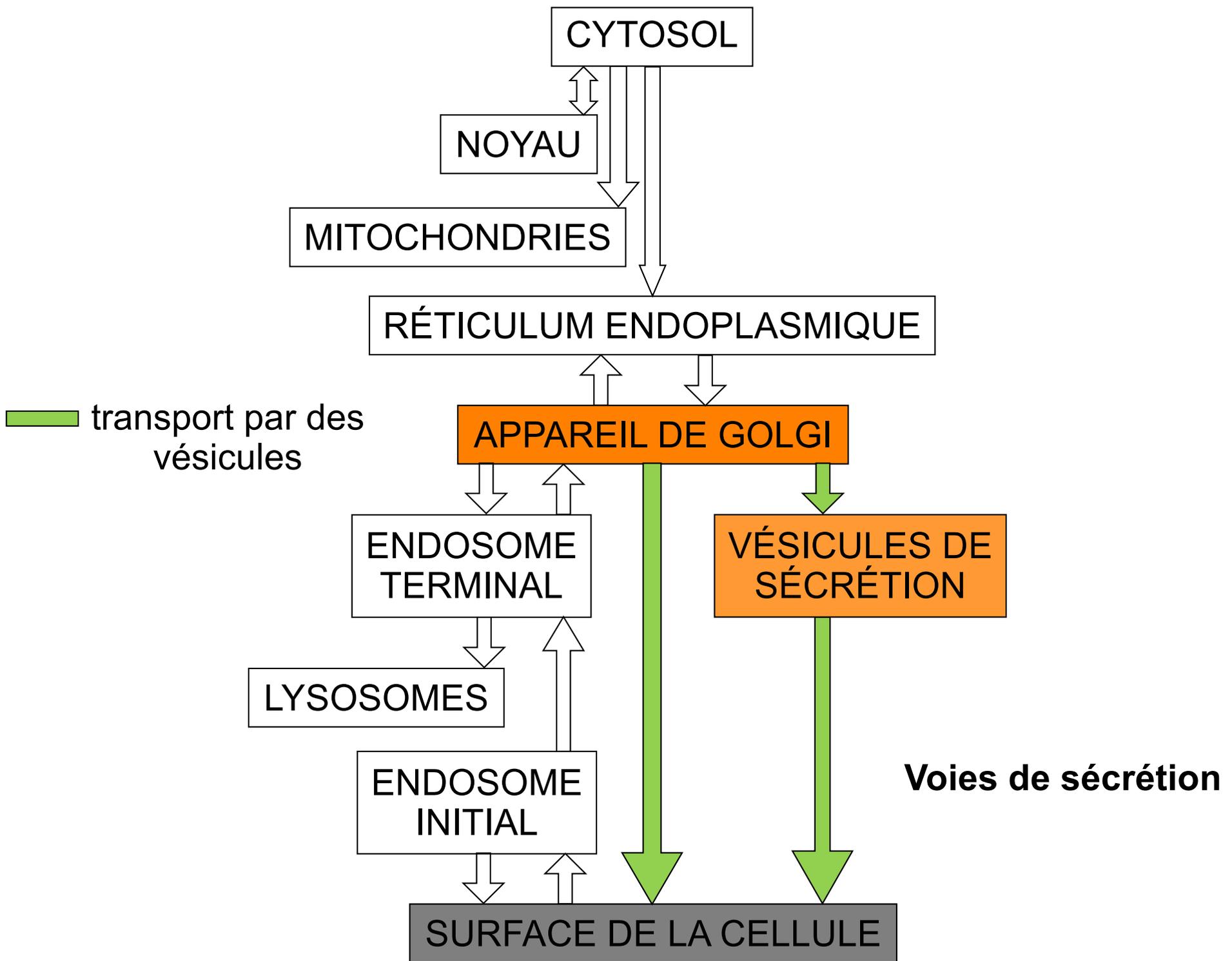
200 nm

Le réseau *trans*-golgien est formé de tubules et de vésicules



— 6 μ m

Transport des vésiculo-tubules à partir de l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane plasmique le long des microtubules



Transport vers la surface de la cellule : vésicules de sécrétion et Exocytose

2 types de voies de Sécrétion

- **Constitutive :**

Lipides et protéines déversés en permanence, sans stockage

Dans tous les types cellulaires

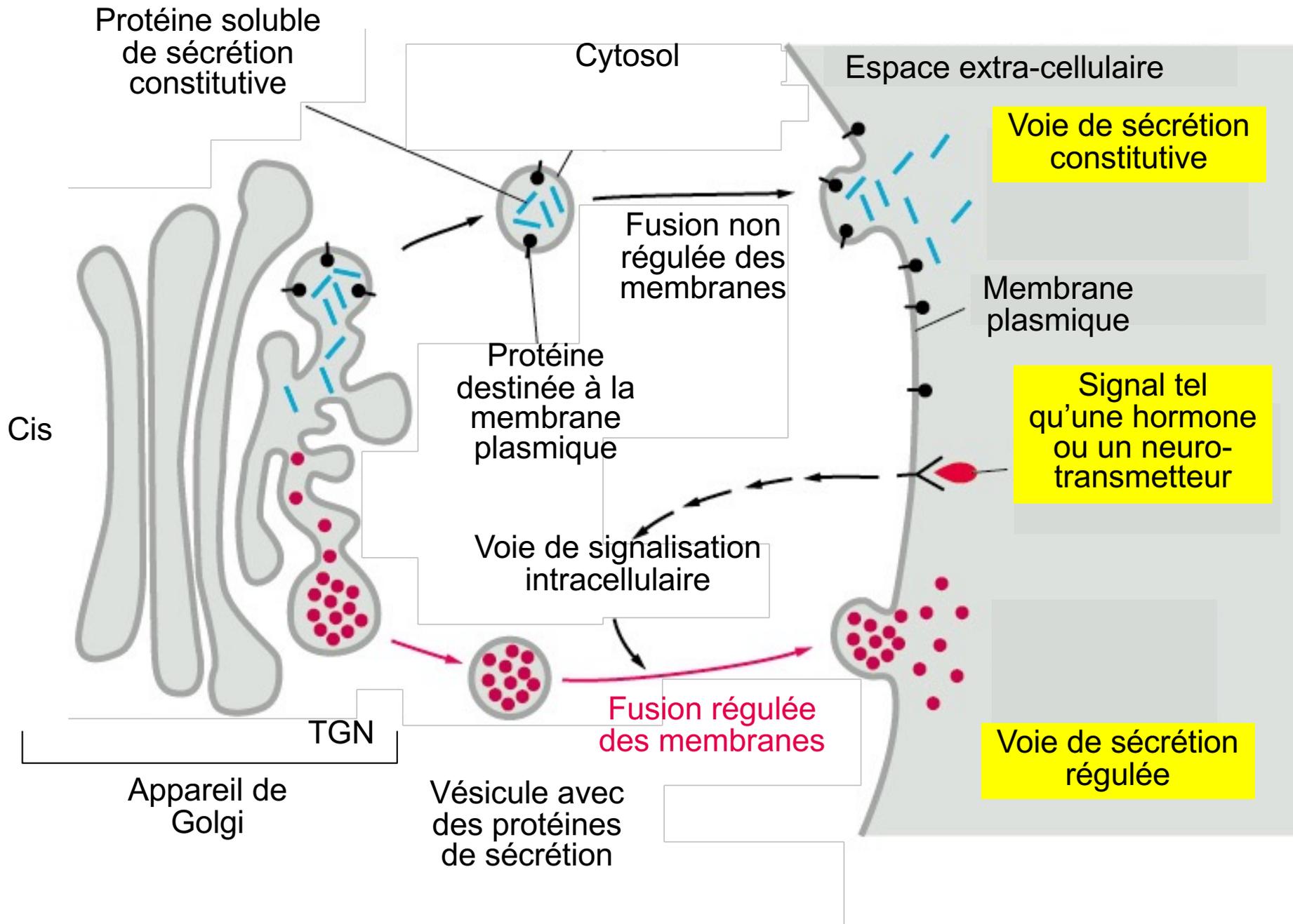
ex : renouvellement des membranes, protéines de la matrice extra-cellulaire

- **Régulée :**

stockage des peptides et des protéines dans des vésicules sous-membranaires (grains de sécrétions)

Libération massive en présence d'un stimulus (nerveux, endocrine)

notamment dans les cellules **nerveuses** et **sécrétrices** (exocrines, endocrines)

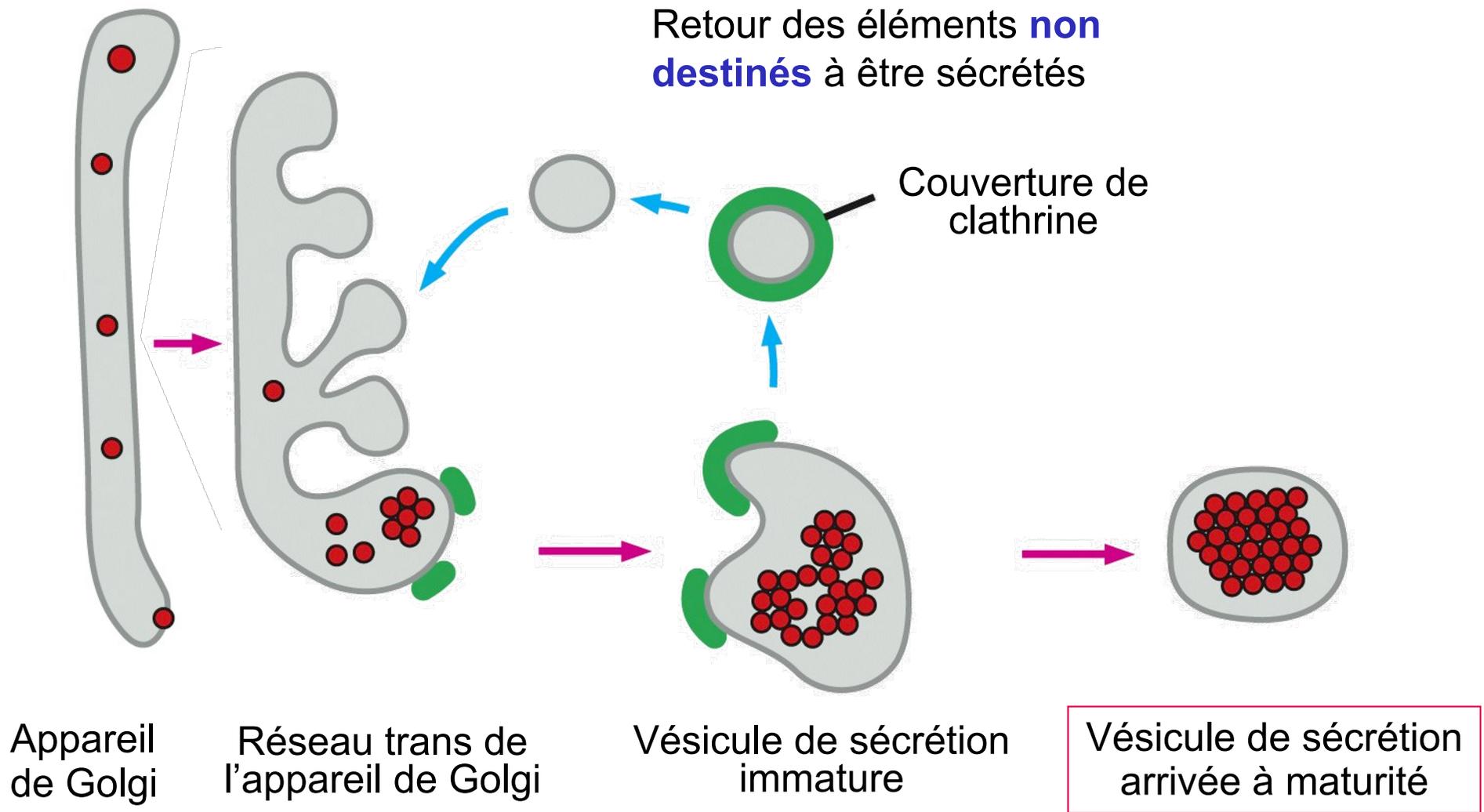


Voie de sécrétion constitutive et voie de sécrétion régulée

Transport vers la surface de la cellule :

vésicules de sécrétion et Exocytose

- Bourgeonnement des vésicules de sécrétion à partir du réseau trans Golgien
Couverture de clathrine nécessaire au bourgeonnement
- **Concentration du matériel d'exocytose** à l'intérieur des vésicules (x 200), à la fois du fait de l'agrégation du matériel à sécréter (-> aspect dense en ME), et du fait du retour du matériel destiné à résider dans le Golgi, via des vésicules couvertes de clathrine
-> Perte de la couverture de clathrine au niveau des vésicules matures



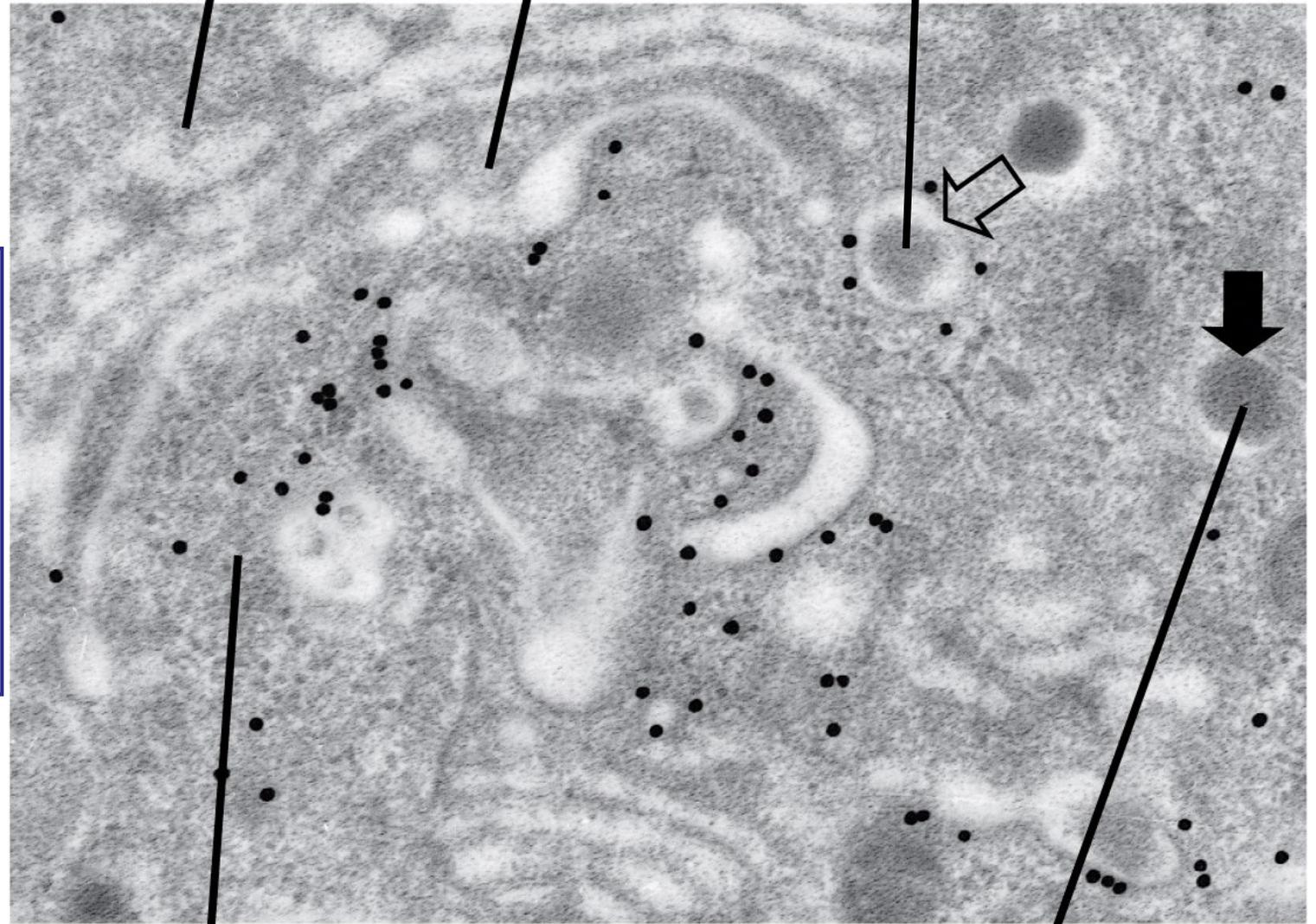
Concentration du matériel d'exocytose à l'intérieur des vésicules

Réseau cis de
l'appareil de Golgi

Empilement des citernes
de l'appareil de Golgi

Insuline dans une
vésicule immature

Immuno-
marquage
en microscopie
électronique avec
des
anticorps
anti-clathrine
couplés à une
particule d'or



Réseau trans
de l'appareil de Golgi

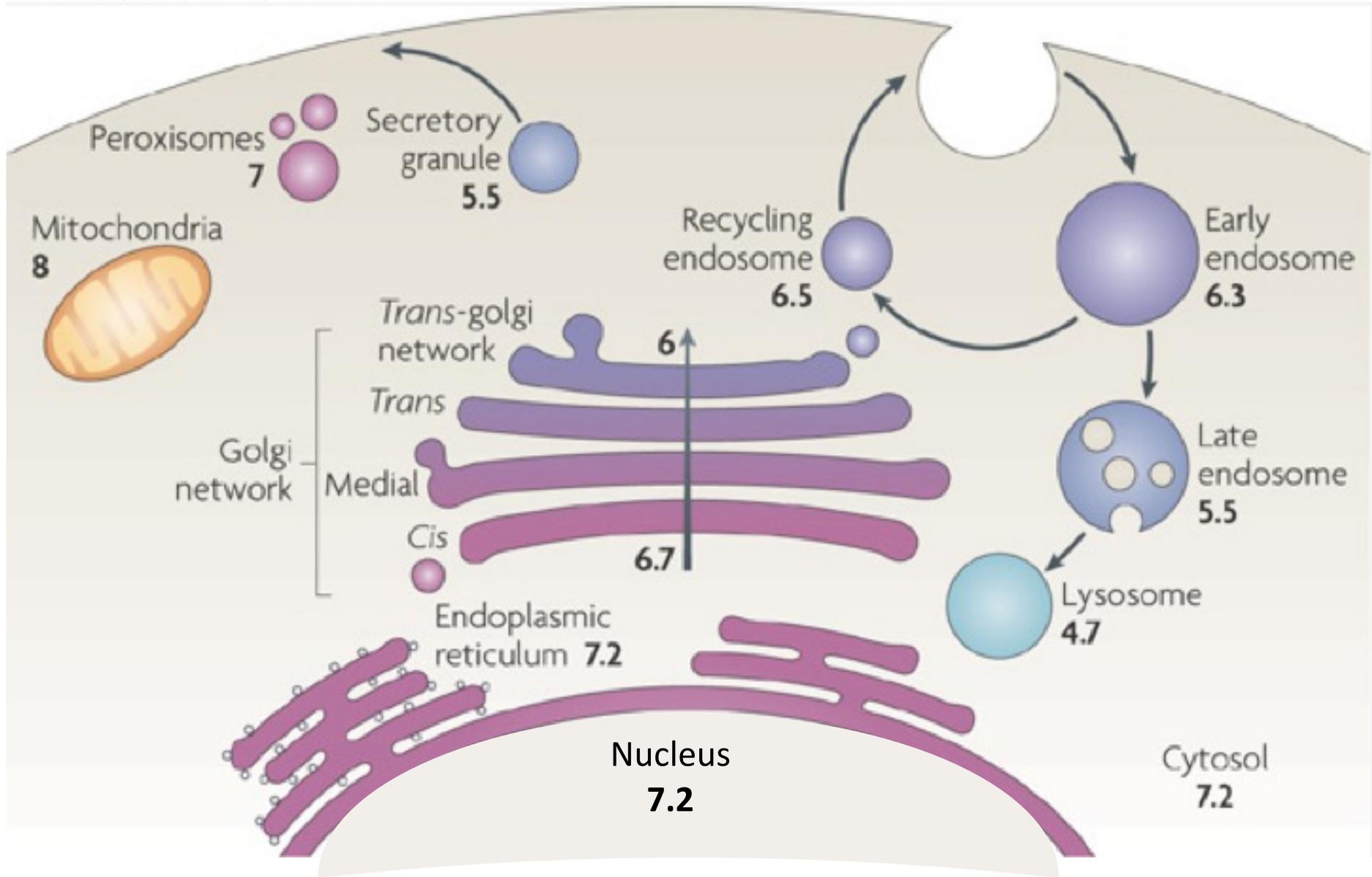
Vésicule de
sécrétion arrivée à maturité

Molécules de clathrine révélées dans les cellules β de Langerhans (ME)

Transport vers la surface de la cellule : vésicules de sécrétion et Exocytose

- Bourgeonnement des vésicules de sécrétion à partir du réseau trans Golgien
Couverture de clathrine nécessaire au bourgeonnement
- **Concentration du matériel d'exocytose** à l'intérieur des vésicules (x 200), à la fois du fait de l'agrégation du matériel à sécréter (-> aspect dense en ME), et du fait du retour du matériel destiné à résider dans le Golgi, via des vésicules couvertes de clathrine
-> Perte de la couverture de clathrine au niveau des vésicules matures
- **Maturation protéolytique** lors de la formation des vésicules de sécrétion (l'acidification des vésicules active les protéases)

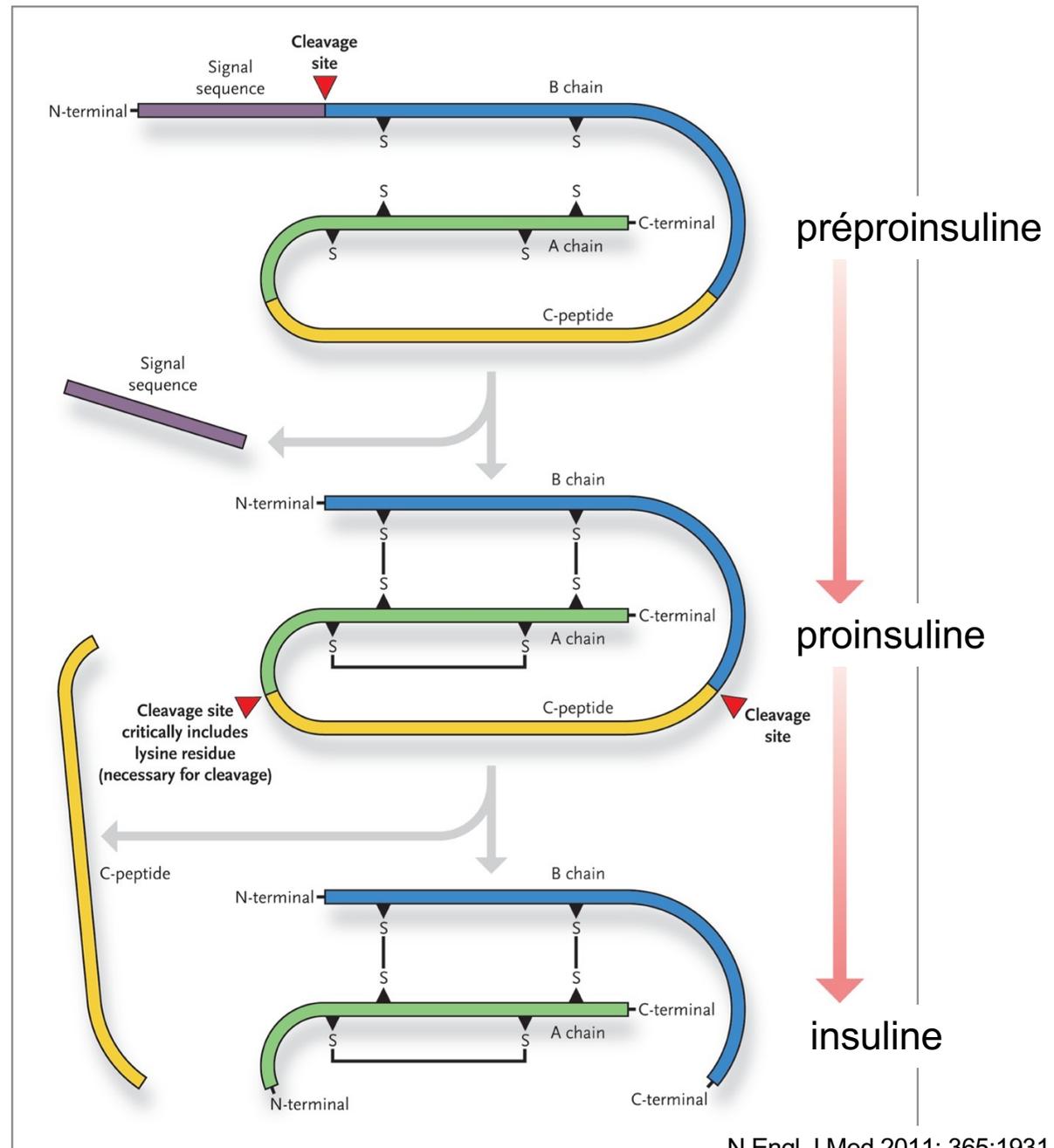
Extracellulaire: 7.2-7.4



pH des différents compartiments intracellulaires

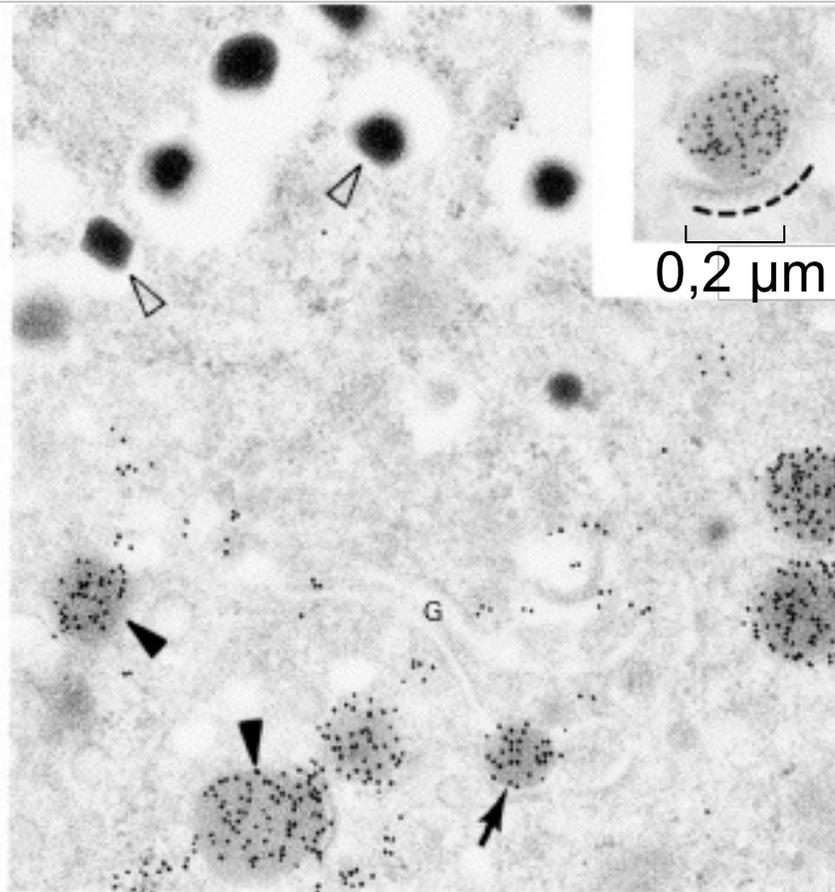
RE:
clivage peptide signal
ponts di-sulfure

Vésicules de sécrétion:
clivage par endopeptidases
-> forme active



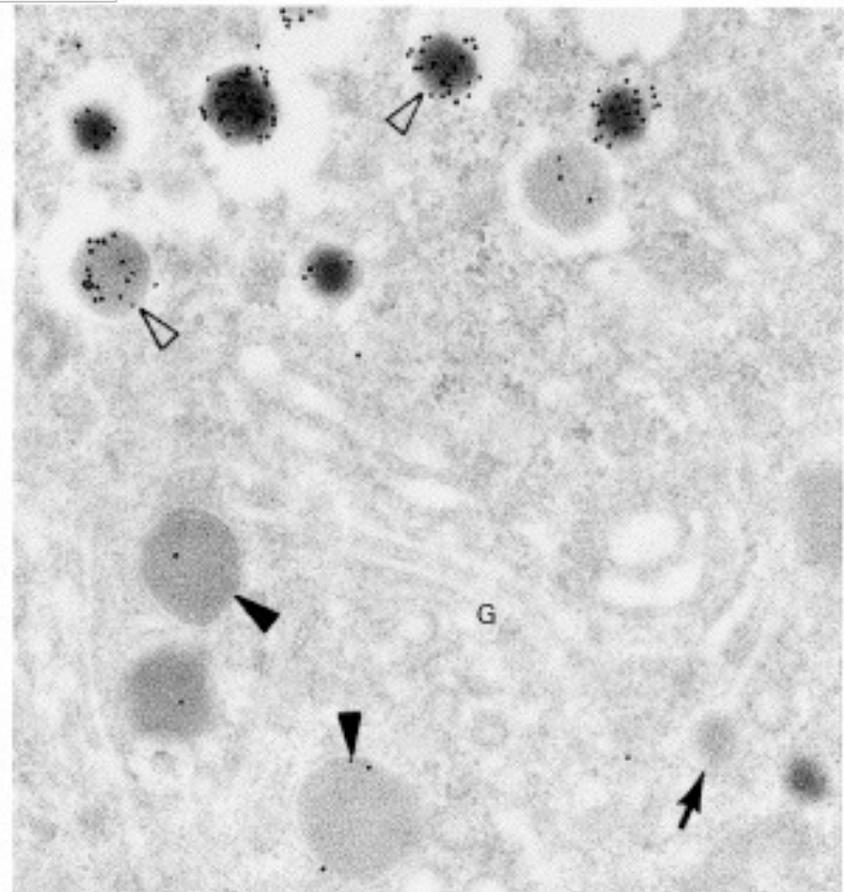
N Engl J Med 2011; 365:1931-1933
DOI: 10.1056/NEJMcibr1109442

**Maturation protéolytique de la pro-insuline en insuline
par des endopeptidases sur la voie de sécrétion régulée**



0,2 μm

Anticorps monoclonal
anti-pro-insuline

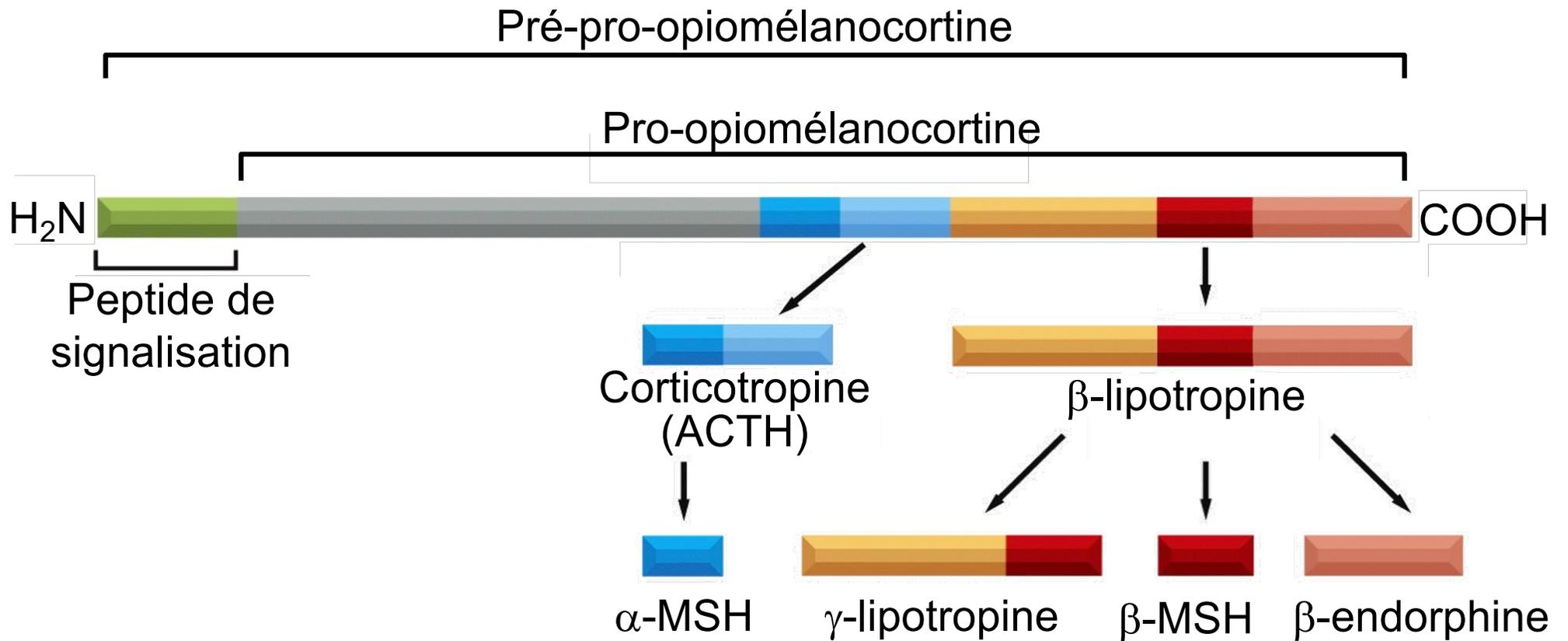


0,5 μm

Anticorps monoclonal
anti-insuline

Pro-insuline 
Insuline 

**Agrégation et coupure de la pro-insuline en insuline
dans les cellules β des îlots de Langerhans (ME)**



ACTH + β-lipotropine dans le lobe antérieur de l'hypophyse

α-MSH + γ-lipotropine + β-endorphine dans le lobe intermédiaire

Différentes voies de maturation d'une pro-hormone, la pro-opiomélanocortine

Transport vers la surface de la cellule : vésicules de sécrétion et Exocytose

- Bourgeonnement des vésicules de sécrétion à partir du réseau trans Golgien
Couverture de clathrine nécessaire au bourgeonnement
- **Concentration du matériel d'exocytose** à l'intérieur des vésicules (x 200), à la fois du fait de l'agrégation du matériel à sécréter (-> aspect dense en ME), et du fait du retour du matériel destiné à résider dans le Golgi, via des vésicules couvertes de clathrine
-> Perte de la couverture de clathrine au niveau des vésicules matures
- **Maturation protéolytique** lors de la formation des vésicules de sécrétion (l'acidification des vésicules active les protéases)
- Transport des vésicules d'exocytose le long des microtubules



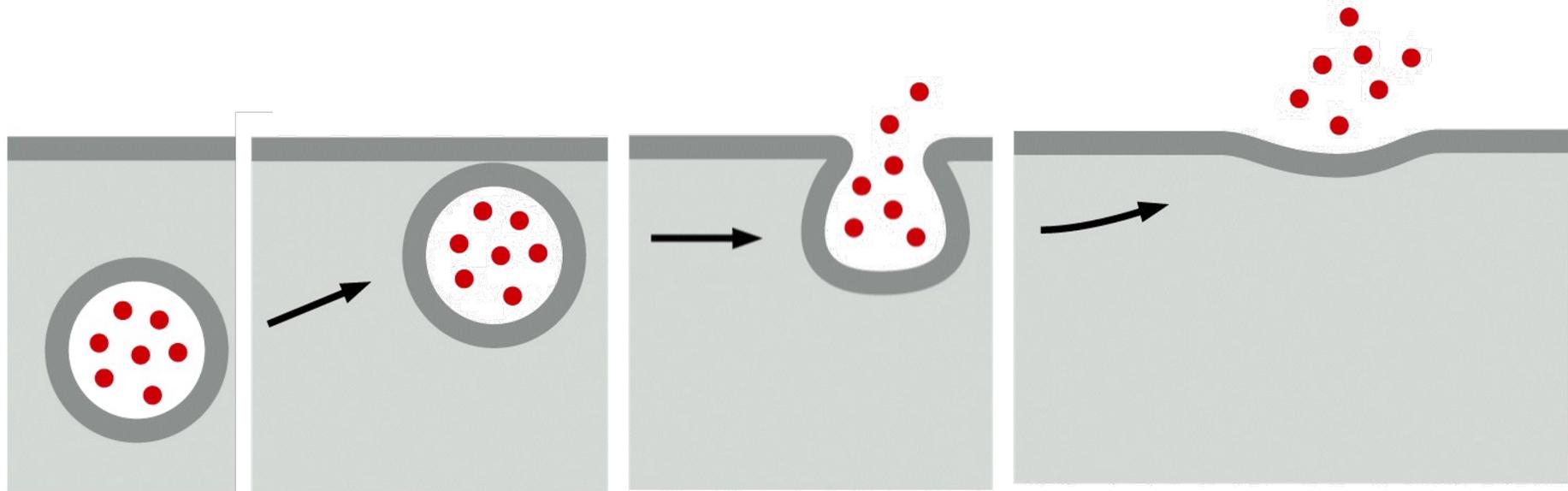
Transport des protéines à partir de l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane plasmique le long des microtubules

Transport

Accostage

Fusion

Libération

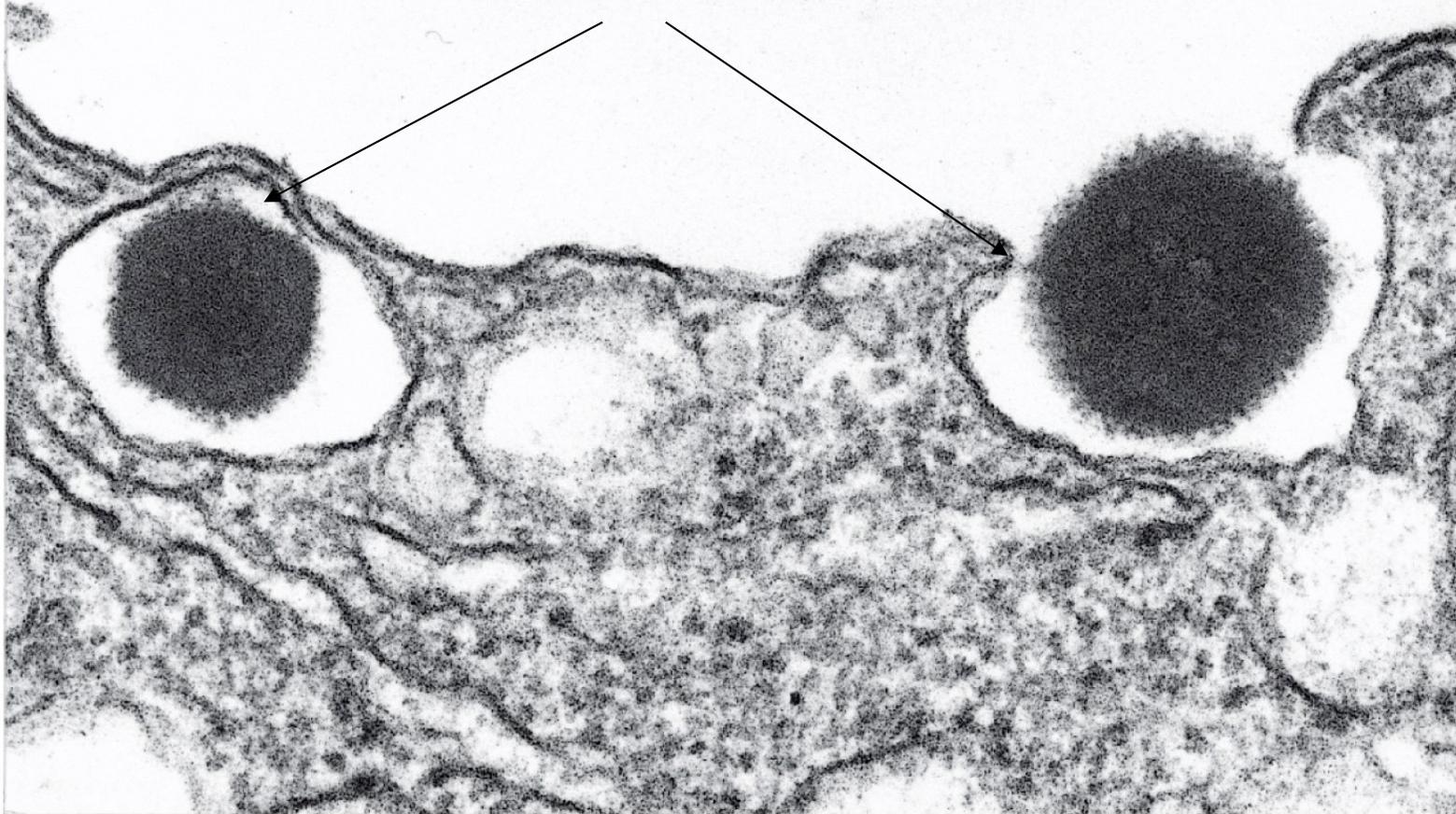


Par des protéines motrices le long des microtubules

Apposition des vésicules à moins de 100 nm de la membrane

Principe de l'exocytose du contenu des vésicules de sécrétion

DCSG : dense core secretory granules (d'après leur aspect en ME)



0,2 μm

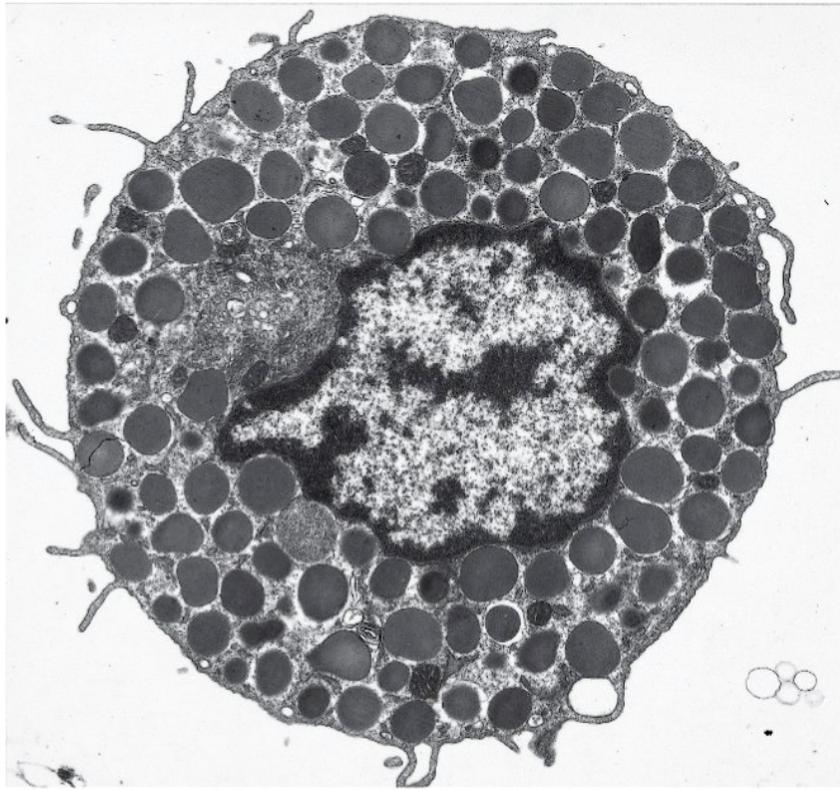
vésicules d'insuline des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas (ME)

Exocytose du contenu des vésicules de sécrétion

Transport vers la surface de la cellule :

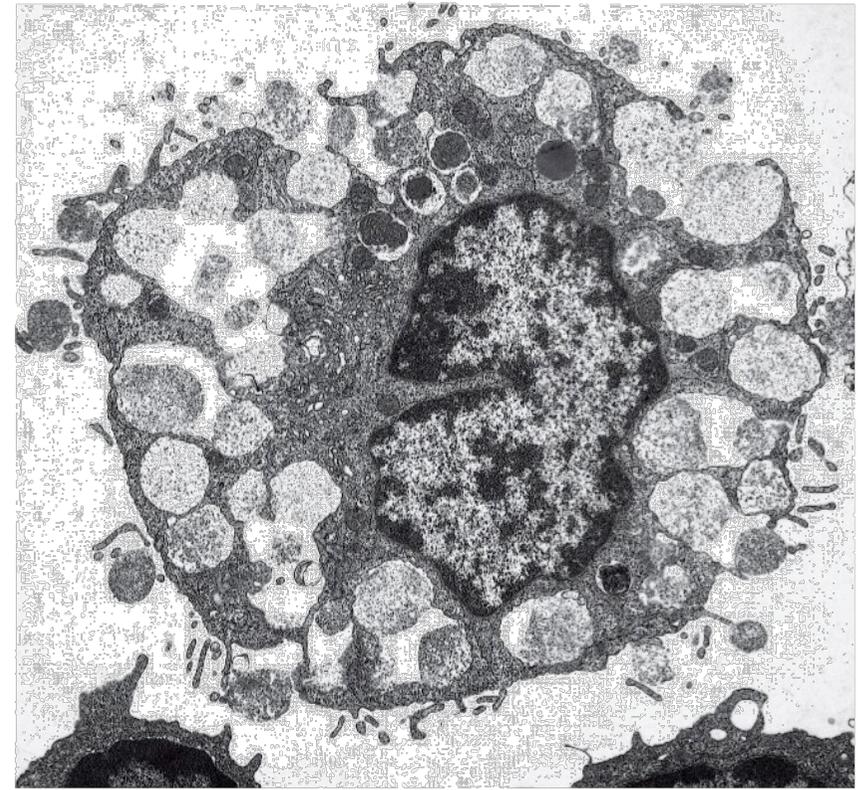
vésicules de sécrétion et Exocytose

- Bourgeonnement des vésicules de sécrétion à partir du réseau trans Golgien
Couverture de clathrine nécessaire au bourgeonnement
- **Concentration du matériel d'exocytose** à l'intérieur des vésicules (x 200), à la fois du fait de l'agrégation du matériel à sécréter (-> aspect dense en ME), et du fait du retour du matériel destiné à résider dans le Golgi, via des vésicules couvertes de clathrine
-> Perte de la couverture de clathrine au niveau des vésicules matures
- **Maturation protéolytique** lors de la formation des vésicules de sécrétion (l'acidification des vésicules active les protéases)
- Transport des vésicules d'exocytose le long des microtubules
- Dans le cas de l'exocytose régulée: **Attente d'un signal**, nerveux ou hormonal, près de la membrane plasmique (ex : mastocyte : granules d'histamine ; neurones: vésicules synpatiques de peptides neurotransmetteurs ; cellules β des ilots de Langerhans du pancréas: vésicules d'insuline)



8 μ m

Cellule non stimulée



Cellule activée
pour la sécrétion d'histamine

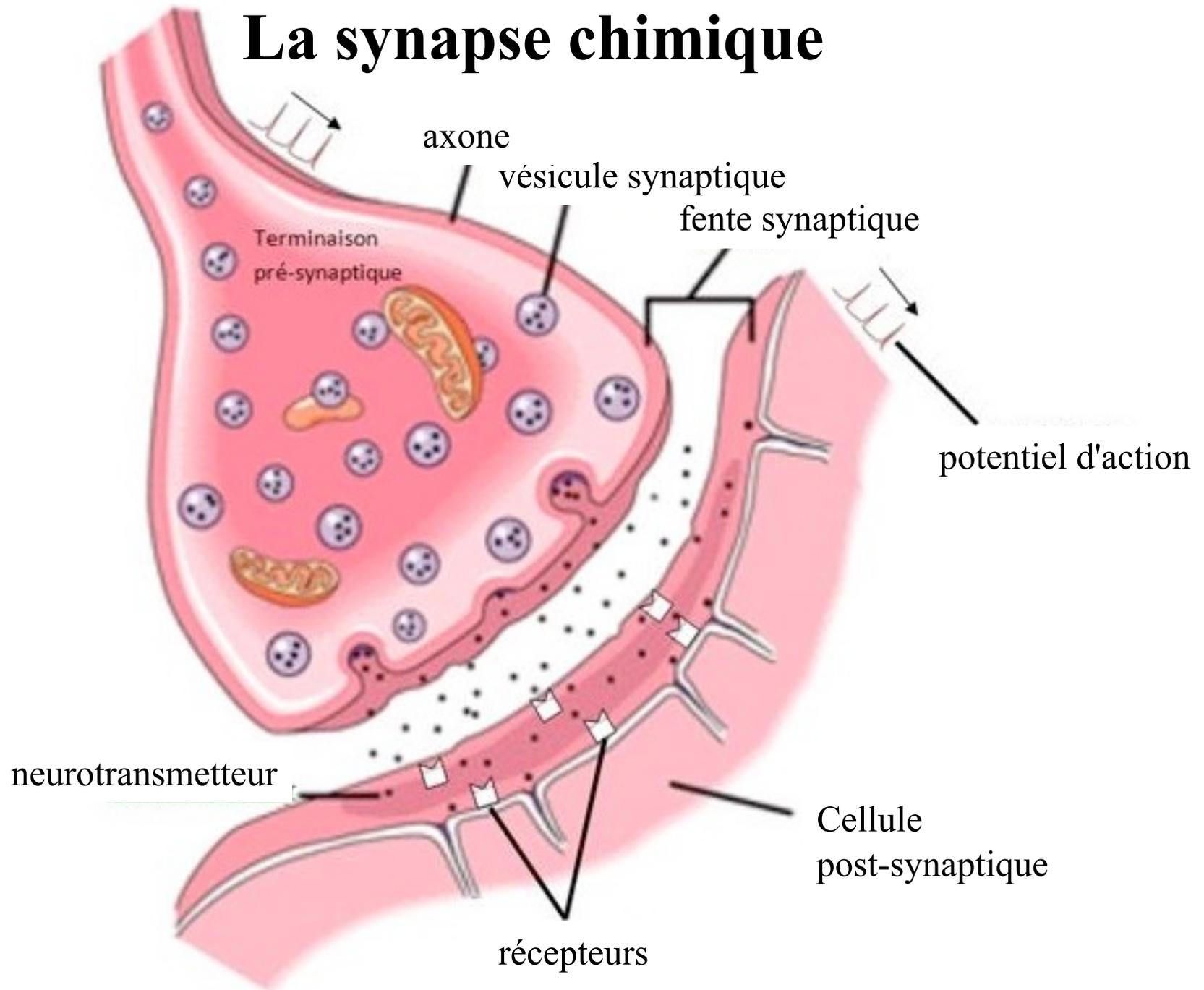
Signal: antigène+IgE -> mastocyte : activation par le récepteur aux IgE -> dégranulation des vésicules chargées en histamine -> réaction inflammatoire

Exocytose généralisée dans un mastocyte de rat

La libération des neurotransmetteurs repose sur une exocytose régulée.

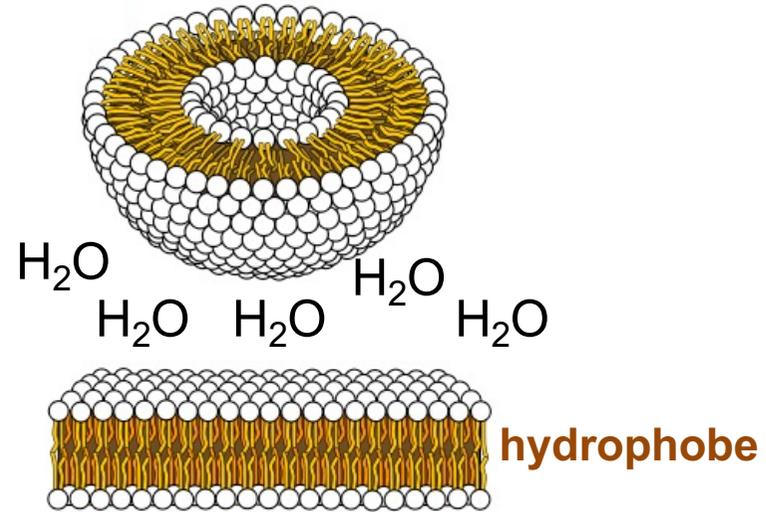


La synapse chimique



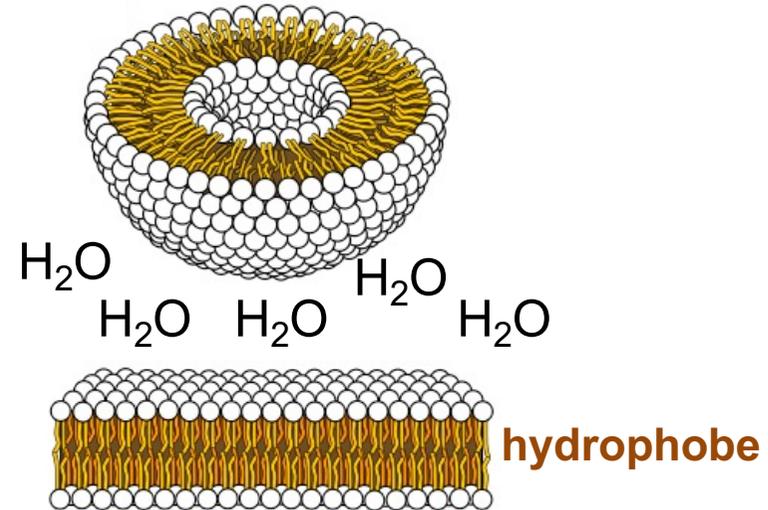
La fusion vésiculaire synaptique

- requiert la fusion de deux bicouches lipidiques

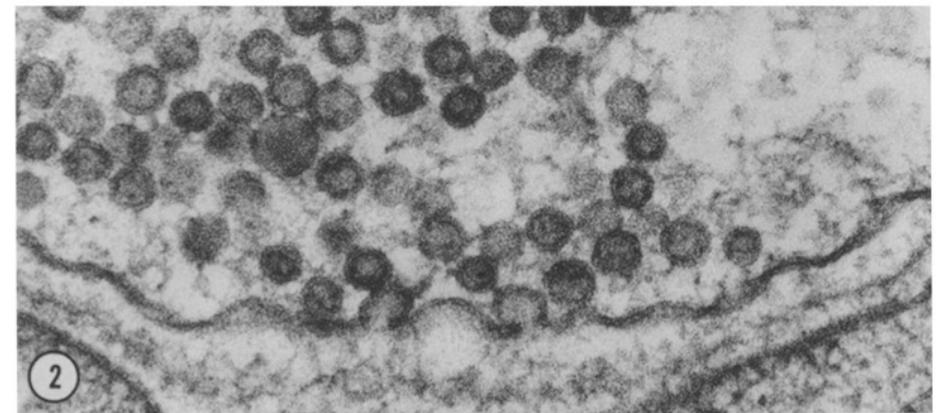
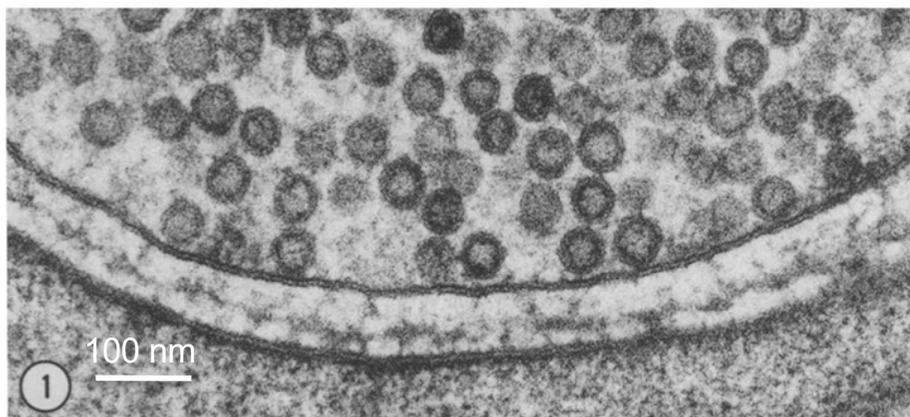


La fusion vésiculaire synaptique

- requiert la fusion de deux bicouches lipidiques



- est rapide

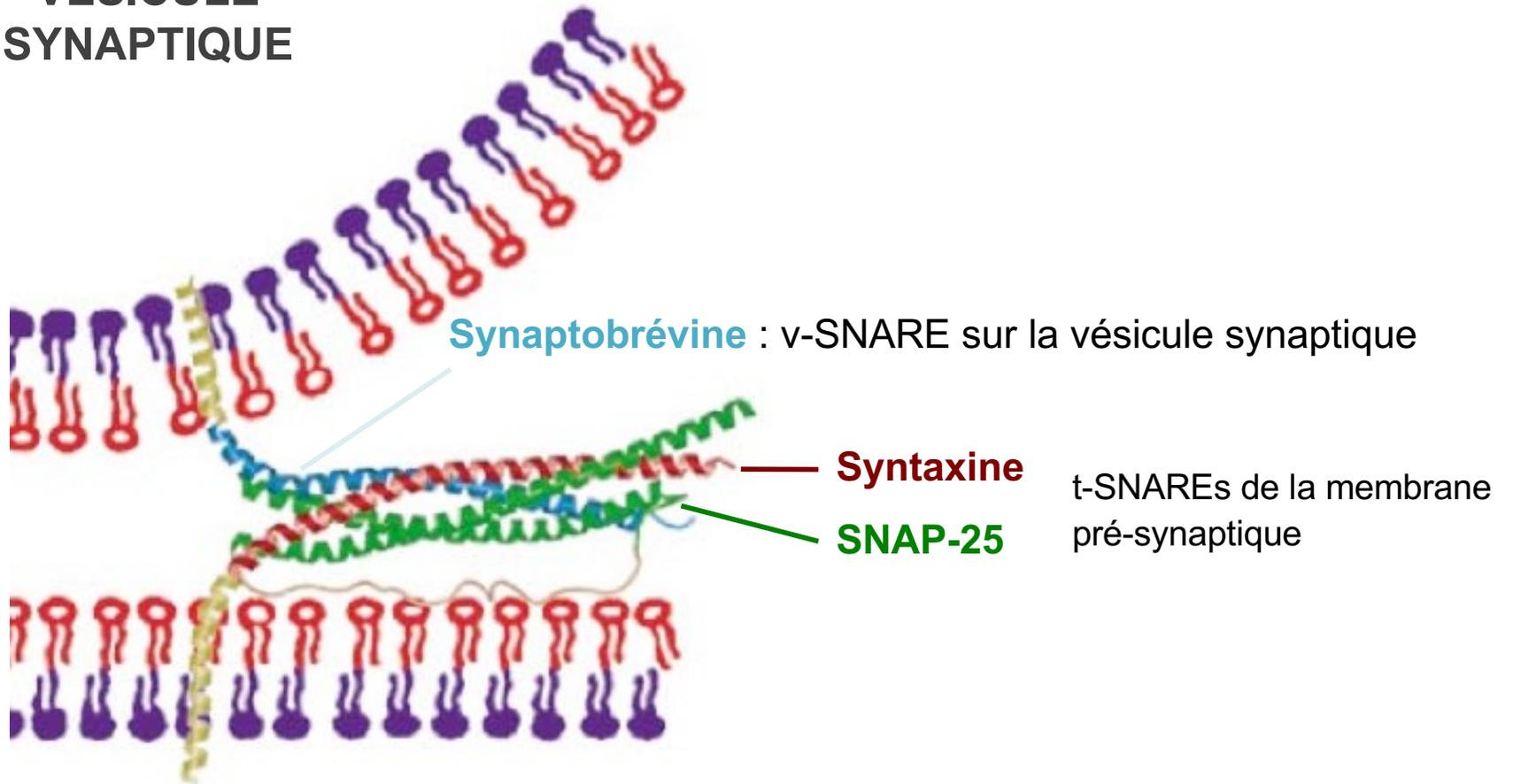


≈ 1 ms
après stimulation

Heuser et Reese (1981)

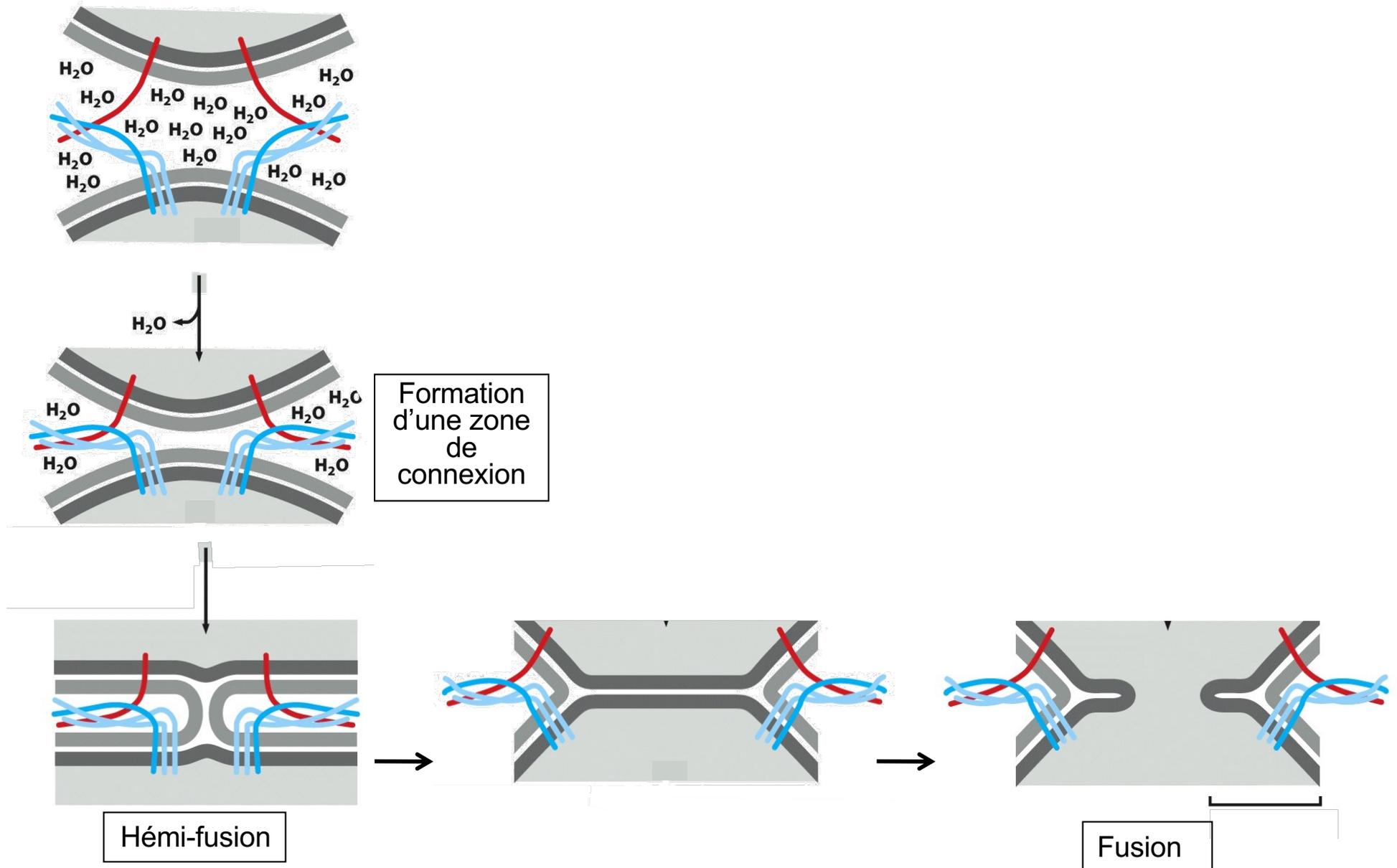
Les protéines SNAREs permettent la fusion vésiculaire

VÉSICULE
SYNAPTIQUE

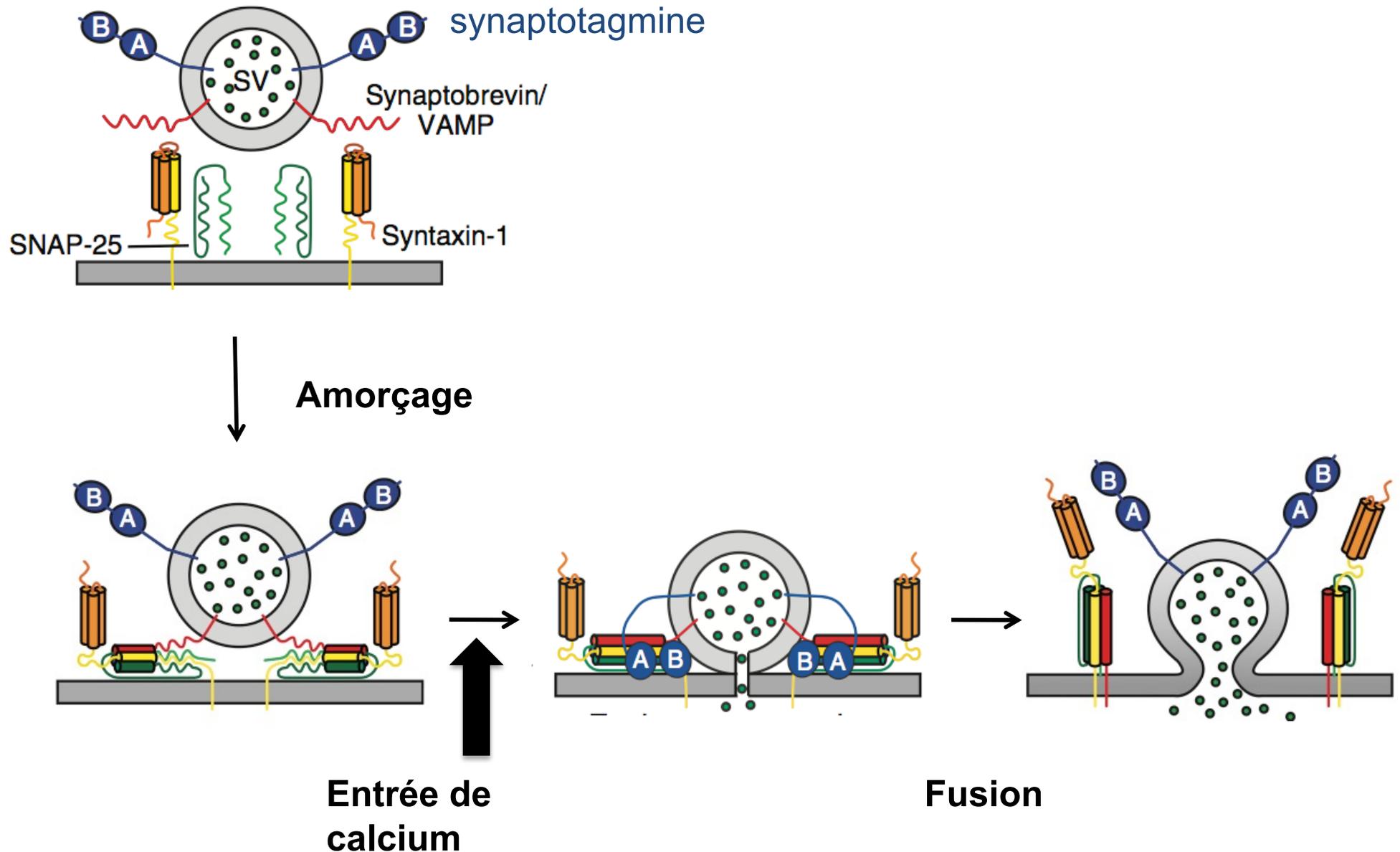


Membrane plasmique d'une cellule nerveuse

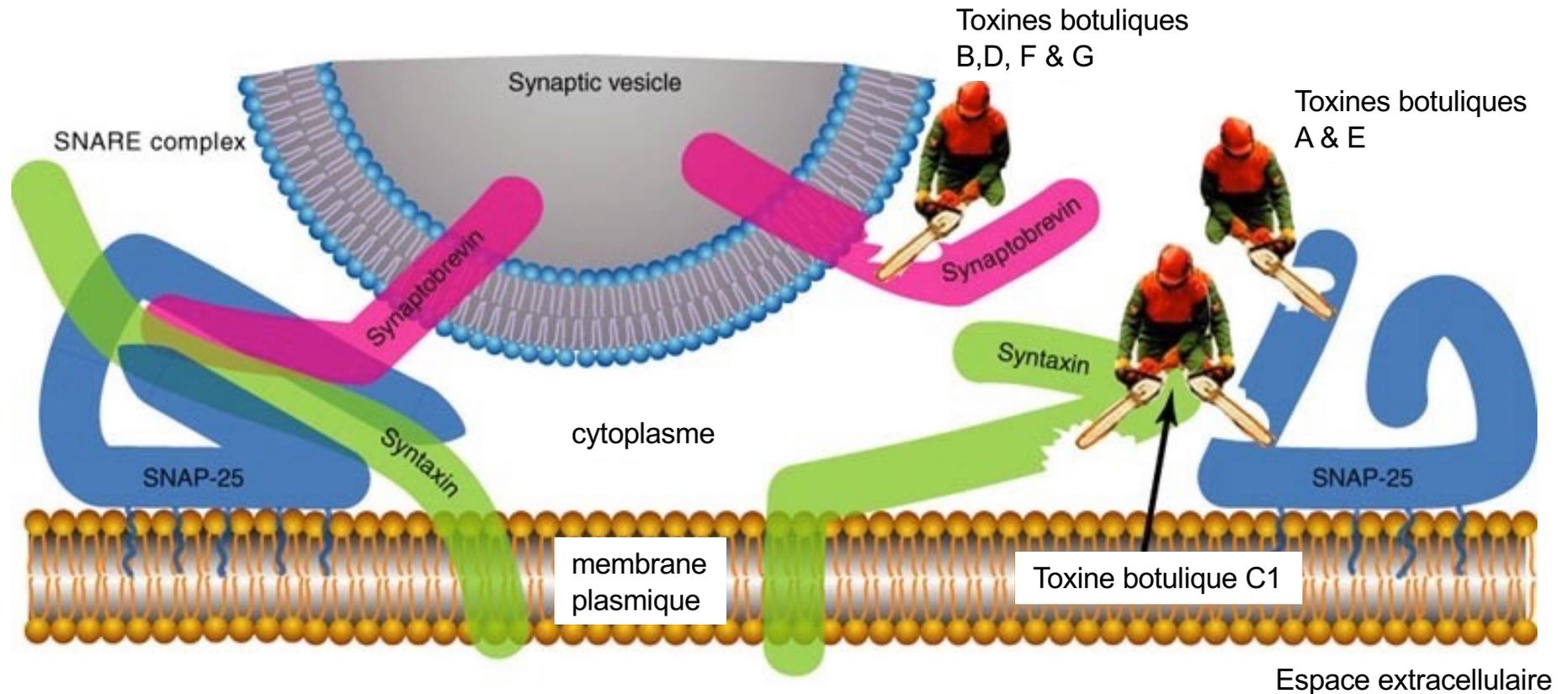
Les protéines SNAREs permettent la fusion vésiculaire



La fusion est déclenchée par des protéines accessoires sensibles au calcium

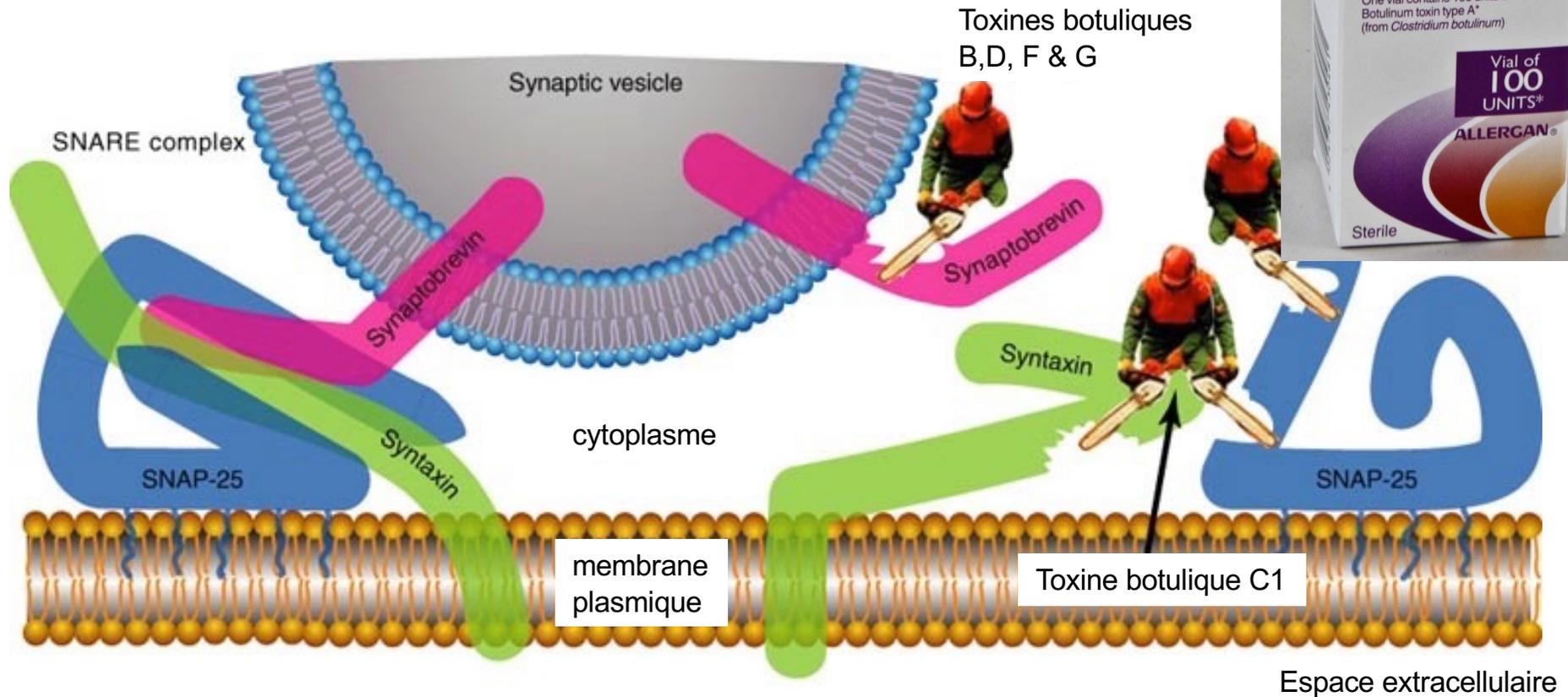


Les toxines botuliques sont des protéases spécifiques des SNAREs

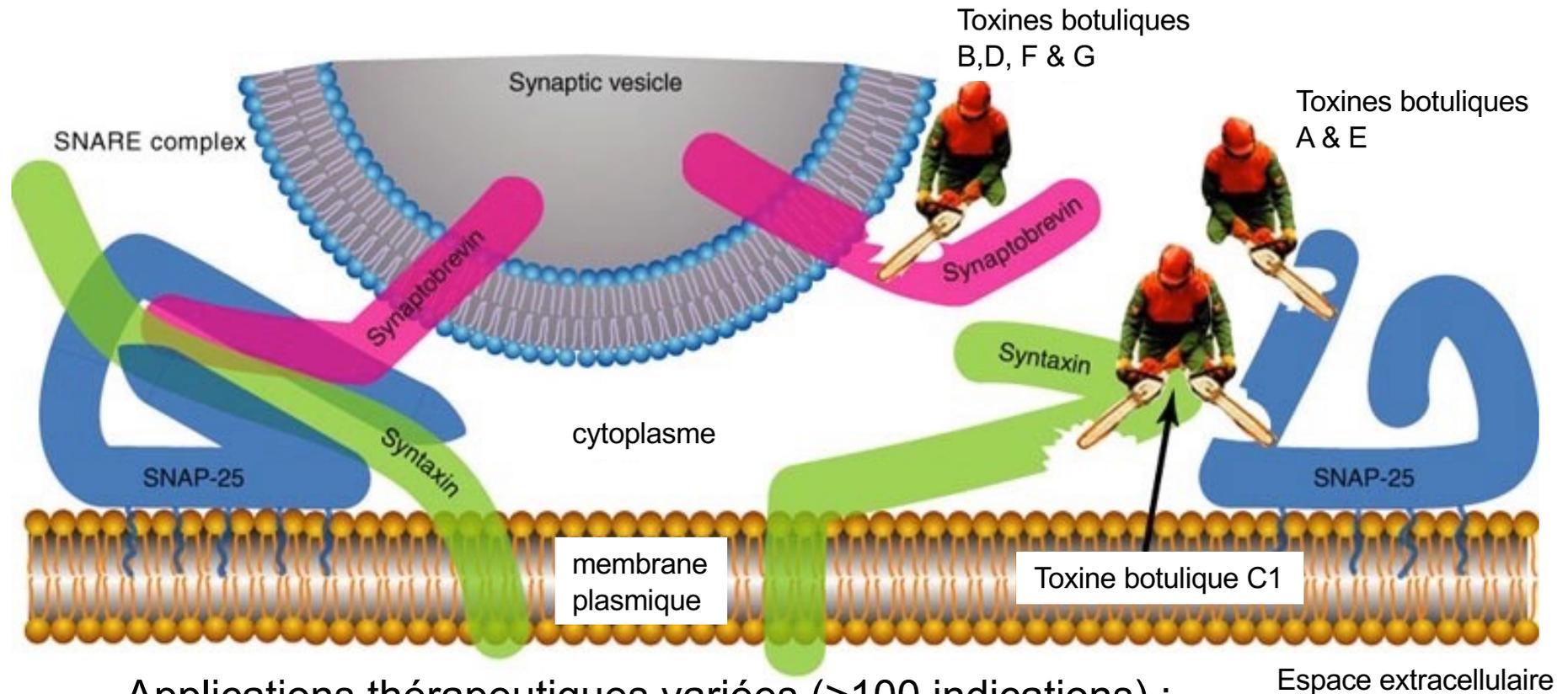


7 toxines différentes produites par *Clostridium botulinum*.

Les toxines botuliques sont des protéases spécifiques des SNAREs



Les toxines botuliques sont des protéases spécifiques des SNAREs



Applications thérapeutiques variées (>100 indications) :

- dystonies (troubles du tonus musculaire)
- hyperhidrose (hypersudation)
- troubles vésicaux,
- ...