

## Bréfeldine A, protéines G et transports membranaires golgiens

Alain Pauloin

### Note ajoutée aux épreuves

Depuis la date d'acceptation de ce manuscrit (15/3/93), plusieurs importantes publications principalement en provenance du groupe de J. Rothman sont parues. L'utilisation du [<sup>3</sup>H]myristyl-ARF-GTP a permis de montrer que la fixation membranaire de ce composé est saturable et qu'elle est rapidement suivie d'une hydrolyse de GTP en GDP, probablement grâce à une protéine GAP membranaire., ARF-GDP se dissocie de la membrane, prévenant ainsi toute accumulation de ARF sur les saccules golgiens. Inversement, en présence de GTP $\gamma$ S, la fixation membranaire de ARF est cumulative et non saturable. Deux pools de ARF-GTP liés à la membrane ont été mis en évidence. Un *pool* labile extractible au moyen de liposomes de phosphatidylcholine et un *pool* stable non extractible, probablement en interaction forte avec une ou des protéines membranaires (Helms *et al.* *J Cell Biol* 1993 ; 121 : 751-60). La présence d'une telle protéine membranaire, en association avec ARF-GTP, pourrait former le site de liaison des *coatomers* (Palmer *et al.* *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 12083-9). Comme pour la clathrine dans le cas des vésicules d'endocytose, les *coatomers* sont responsables de la formation des vésicules golgiennes (*budding*) (Orci *et al.* *Nature* 362 : 648-52). Enfin deux groupes indépendants ont simultanément démontré la présence d'une nouvelle sous-unité coatomérique de 102 kDa appelée  $\beta$ '-COP. Le tiers de cette protéine coté N-terminal est constitué par la répétition de cinq motifs (*WD-40 repeats*) typiques de la sous-unité  $\beta$  des protéines G trimériques. La  $\beta$ '-COP pourrait ainsi constituer la protéine de liaison avec ARF-GTP et/ou être responsable de la dissociation des *coatomers* avant fusion de la vésicule golgienne avec le compartiment accepteur (Stenbeck *et al.* *EMBO J* 1993 ; 12 : 2841-5 ; Harrison-Lavoie *et al.* *EMBO J* 1993 ; 12 : 2487-53).

### ADRESSE ET TIRÉS À PART

A. Pauloin : chargé de recherche au Cnrs. Inra, centre de recherche de Jouy, laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France.

m/s n° 8-9 vol. 9, août-septembre 93

Les processus sécrétoires sont étroitement réglés par de multiples systèmes de contrôle, notamment des petites protéines G et des grandes protéines G trimériques. Le transport des protéines entre le réticulum endoplasmique et les différents compartiments de l'appareil de Golgi est assuré par des vésicules recouvertes dépourvues de clathrine. Le manteau de ces vésicules, constitué de *coatomers*, s'assemble en réponse à des signaux, relayé par de grandes protéines G vers une petite protéine G, ARF. Celle-ci, activée sous sa forme liée au GTP, se fixe à la membrane des vésicules, permettant alors l'assemblage du manteau. L'antibiotique d'origine fongique, la bréfeldine A, semble bloquer l'activation d'ARF, inhibant ainsi la sécrétion et, à l'inverse, favorisant le flux rétrograde du Golgi vers le réticulum endoplasmique.

La compartimentation et l'organisation fonctionnelle des cellules eucaryotes reposent sur la composition spécifique en protéines et en lipides des différents organites cellulaires. La mise en place et le maintien de cette organisation impliquent l'existence de mécanismes de tri et de transport permettant aux protéines néosynthétisées d'être délivrées à leur compartiment de destination. Ce transport des protéines entre organites est un processus d'une effarante complexité. Qu'elles soient engagées dans la voie de l'endocytose ou de la sécrétion, les protéines doivent être empaquetées dans des vésicules nées du compartiment expéditeur (appelé compartiment donneur). Ces vésicules doivent ensuite traverser le cytoplasme, reconnaître et fusionner avec le compartiment destinataire (le compartiment receveur) afin de libérer leur contenu. Pour comprendre le fonctionnement du transport vésiculaire des protéines, deux questions

principales doivent être formulées. La première concerne le mécanisme de ce transport : comment les vésicules sont-elles formées, transportées et consommées ? La seconde concerne le rôle joué par la protéine transportée dans son propre ciblage : pourquoi une protéine en transit est-elle transportée quand sa voisine, nécessaire au fonctionnement de l'organite, est assignée à résidence ?

Des progrès immenses ont été réalisés ces dix dernières années dans la compréhension des phénomènes de transport vésiculaire intracellulaire, essentiellement grâce à la convergence des techniques de la biochimie, de la biologie et de la génétique. L'isolement et la caractérisation de mutants de sécrétion chez la levure, la détermination de la protéine responsable du phénotype observé, la recherche de son homologue dans les cellules de mammifère, enfin la mise au point de systèmes *in vitro* capables de reproduire une étape de transport donnée où tous les acteurs sont identifiables

## RÉFÉRENCES

1. Mellman I, Simons K. The Golgi complex : *in vitro veritas* ? *Cell* 1992 ; 68 : 829-40.
  2. Pauloin A. Vésicules recouvertes, polypeptides d'assemblage et phosphorylation. *médecine/sciences* 1991 ; 7 : 561-8.
  3. Waters MG, Serafini T, Rothman JE. Coatamer : a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature* 1991 ; 349 : 248-51.
  4. Serafini T, Stenbeck G, Brecht A, Lottspeich F, Orci L, Rothman JE, Wieland F. A coat subunit of Golgi-derived non-clathrin-coated vesicles with homology to the clathrin-coated vesicle coat protein B-adaptin. *Nature* 1991 ; 349 : 215-20.
  5. Kaziro Y, Itoh H, Kozasa T, Nakafuku M, Satoh T. Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu Rev Biochem* 1991 ; 60 : 349-400.
  6. Stow JL, De Almeida JL, Narula N, Holtzman EJ, Ercolani L, Ausiello DA. A heterotrimeric G protein, G $\alpha$  i-3, on Golgi membranes regulates the secretion of a heparan sulfate proteoglycan in LLC-PK1 epithelial cells. *J Cell Biol* 1991 ; 114 : 1113-24.
  7. Ktistakis NT, Linder ME, Roth MG. Action of brefeldin A blocked by activation of a pertussis toxin sensitive G protein. *Nature* 1992 ; 356 : 344-6.
  8. Malhotra V, Serafini T, Orci L, Sheperd JC, Rothman JE. Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack. *Cell* 1989 ; 58 : 329-36.
  9. Donaldson JG, Kahn RA, Lippincott-Schwartz J, Klausner RD. Binding of ARF and  $\beta$ -COP to Golgi membranes : possible regulation by a trimeric G protein. *Science* 1991 ; 254 : 1197-9.
  10. Goud B. Le transport vésiculaire des cellules eucaryotes est contrôlé par des GTP-ases. *médecine/sciences* 1992 ; 8 : 326-33.
  11. Kahn RA, Gilman AG. The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of Gs by cholera toxin is itself a GTP binding protein. *J Biol Chem* 1986 ; 261 : 7906-11.
  12. Stearns T, Willingham MC, Botstein D, Kahn RA. ADP-ribosylation factor is functionally and physically associated with the Golgi complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 1238-42.
- et accessibles expérimentalement, ont permis d'aborder la dissection moléculaire de ces phénomènes de transport, de commencer d'établir le catalogue des protéines responsables des différents événements observés et de préciser comment elles interagissent entre elles.
- Parmi toutes ces protéines récemment découvertes, deux familles de protéines G (ainsi appelées en raison de leur capacité à lier réversiblement le GTP ou le GDP) paraissent jouer un rôle prépondérant dans le trafic membranaire : les protéines G trimériques et les protéines G monomériques dites « petites protéines G ». De nombreux travaux ont suggéré que le contrôle de la transduction des signaux externes serait plus spécifiquement dévolu aux protéines G trimériques tandis que les petites protéines G seraient plus particulièrement impliquées dans le contrôle des trafics vésiculaires. Cependant, cette vision un peu manichéenne du partage des tâches dévolues aux protéines G s'est estompée dernièrement depuis la mise en évidence de protéines G trimériques dans la voie de la biosynthèse-sécrétion.
- Cet article se propose de faire le point de nos connaissances sur le rôle des protéines G trimériques et de la petite protéine G, ARF, dans les transports vésiculaires intragolgiens, à la lumière des nombreuses données expérimentales obtenues dernièrement au moyen d'un antibiotique — unique par son action sur l'organisation et le fonctionnement de l'appareil de Golgi —, la bréfeldine A.

### L'appareil de Golgi

L'appareil de Golgi est constitué d'une série de compartiments membranaires qui assurent les modifications post-traductionnelles (N- ou O-glycosylation, sulfatation, phosphorylation) des protéines synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique et le ciblage de ces diverses protéines vers leur destination finale (sécrétion, lysosome, noyau...). L'appareil de Golgi est aussi engagé dans la synthèse des glycolipides et des protéoglycanes (pour revue, voir [1]). La morphologie de l'appareil de Golgi est caractéristique. Observé en microscopie électronique, il apparaît comme un empilement de citernes

plates aux extrémités dilatées (figure 1A). De nombreuses vésicules, dont certaines présentent une membrane épaissie, sont également visibles aux extrémités des citernes.

L'appareil de Golgi possède une polarité morphologique et fonctionnelle. Les protéines nouvellement synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique entrent dans l'appareil de Golgi par la face *cis* par l'intermédiaire du réseau tubulaire *cis* (ou CGN pour *cis-Golgi network*), traversent l'empilement de citernes et ressortent par la face *trans* pour entrer dans le réseau tubulaire *trans* (ou TGN pour *trans-Golgi network*).

En raison de cette organisation vectorielle des transports golgiens et de la nature séquentielle des mécanismes de la glycosylation des protéines (ces dernières sont progressivement équipées de leurs glucides au cours de la traversée de l'organite comme sur une chaîne de montage), il est communément admis que l'appareil de Golgi est constitué d'une série d'unités membranaires fonctionnelles distinctes.

Le transport des protéines entre les divers compartiments de l'appareil de Golgi semble être majoritairement assuré par l'intermédiaire de vésicules recouvertes dépourvues de clathrine. La sous-unité constitutive du manteau est appelée *coatamer*. Contrairement à la clathrine organisée sous la forme si caractéristique du triskèle (pour revue, voir [2]), les *coatamers* sont de nature globulaire. Ils sont formés par l'assemblage de quatre protéines majeures appelées  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - et  $\delta$ -COP (pour *coated protein*) en association stœchiométrique avec plusieurs autres polypeptides de 36, 21 et 20 kDa [3].

Le microséquençage de la  $\beta$ -COP a non seulement révélé qu'elle est identique à une protéine de 110 kDa du Golgi, mais qu'elle est fortement homologue à la  $\beta$ -adaptine [4]. Cette protéine est une sous-unité constitutive des polypeptides d'assemblage qui interviennent comme intermédiaires entre la vésicule d'endocytose et le manteau de clathrine, et dans la reconnaissance des protéines à inter-naliser. Par analogie avec la clathrine, il a été proposé que les *coatamers* pourraient faciliter le bourgeonnement des saccules golgiens au cours de la for-

mation des vésicules. D'un point de vue fonctionnel, la différence majeure entre les vésicules d'endocytose recouvertes de clathrine et les vésicules recouvertes golgiennes réside dans la sélectivité des protéines transportées. Dans le premier cas, une protéine est capturée par endocytose et transportée après interaction spécifique avec son récepteur. Dans le second cas, les protéines sont apparemment transportées en vrac (hypothèse du *bulk flow*) entre les différents compartiments golgiens. Cependant, un mécanisme de ségrégation, associé aux citernes golgiennes, doit pouvoir différencier les protéines résidentes des protéines en transit, pour ne transporter que ces dernières dans les vésicules recouvertes.

### Rôle des protéines G dans les transports golgiens

Les protéines G trimériques de la membrane plasmique ont été les premières protéines G mises en évidence. Elles agissent comme des intermédiaires capables d'assurer la transduction de signaux du milieu extérieur vers un effecteur intracellulaire grâce à des récepteurs glycoprotéiques à sept hélices transmembranaires (pour revue voir [5]). Elles sont constituées de trois sous-unités appelées  $G_\alpha$  (39-52 kDa),  $G_\beta$  (35-36 kDa) et  $G_\gamma$  (7-10 kDa) par ordre de masse décroissant. Le mécanisme de fonctionnement de ces protéines G est couplé à un cycle de fixation du GTP suivi de son hydrolyse en GDP et  $P_i$  (figure 2). Les protéines G trimériques ont également été mises en évidence ces dernières années dans les membranes des granules de sécrétion, du réticulum endoplasmique, des endosomes et de l'appareil de Golgi. L'implication d'une protéine de type  $G_i$  (inhibitrice) dans la régulation des transports golgiens a été révélée par transfection de cellules épithéliales de rein au moyen de l'ADN codant pour la sous-unité  $G_{\alpha 13}$ . La surexpression de cette protéine au niveau du Golgi provoque une baisse de la sécrétion constitutive des protéoglycans dans ces cellules [6]. La toxine de *B. pertussis* qui permet l'ADP-ribosylation de  $G_\alpha \cdot \text{GDP}$ , et interdit de ce fait son interaction avec le récepteur et l'échange nucléo-

tidique GDP/GTP, non seulement lève l'inhibition induite par  $G_{\alpha 13}$  mais aussi stimule la sécrétion dans les cellules non transfectées [7]. La participation des protéines G trimériques aux transports golgiens a également été montrée par l'approche inverse, qui consiste à bloquer leur fonctionnement. Deux types de composés ont été utilisés : les analogues non métabolisables du GTP tels que le Gpp[NH]p ou le GTP $\gamma$ S, qui maintiennent  $G_\alpha$  dans un état continuellement actif, et l'ion fluoro-aluminate

( $\text{AlF}_4^-$ ), qui mime le phosphate  $\gamma$  du GTP et de ce fait rend active la sous-unité  $G_\alpha \cdot \text{GDP}$ . L'utilisation du GTP $\gamma$ S sur des cellules perméabilisées ou de  $\text{AlF}_4^-$  sur des cellules intactes, inhibe irréversiblement les transports entre les différents compartiments de l'appareil de Golgi tout en favorisant l'accumulation des vésicules recouvertes golgiennes. Cela montre que l'hydrolyse du GTP n'est pas requise lors des étapes précoces de la formation de la vésicule, mais plutôt au moment de la libération des *coa-*

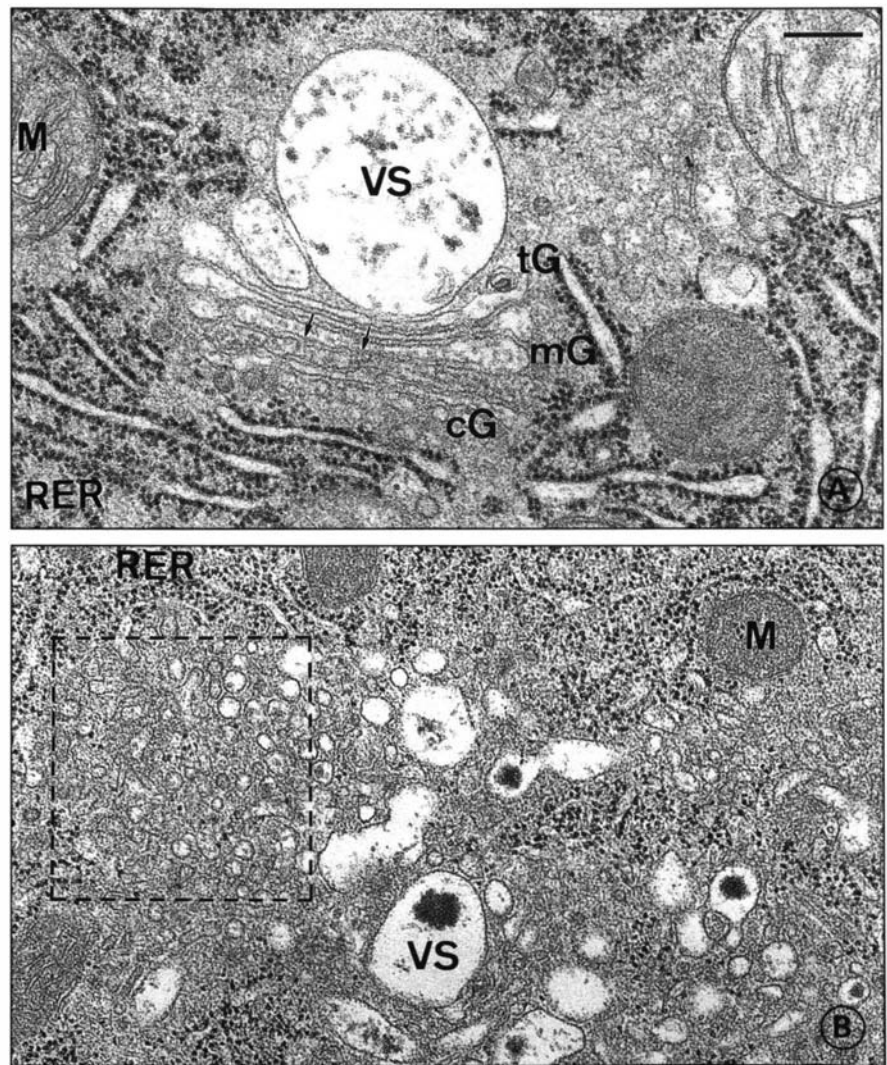


Figure 1. **Action de la bréfeldine A sur la morphologie de la région golgienne d'une cellule épithéliale mammaire de lapine en lactation.** A. Cellule non traitée : cG : cis-Golgi, mG : Golgi médian, tG : trans-Golgi, M : mitochondrie, RER : réticulum endoplasmique rugueux, VS : vésicule sécrétoire. Les flèches désignent les anastomoses entre les citernes golgiennes (barre = 0,2  $\mu\text{m}$ ). B. Cellule incubée 5 minutes en présence de bréfeldine A (50  $\mu\text{M}$ ). La région golgienne (délimitée par les pointillés) présente l'aspect d'un réseau tubulo-vésiculaire interconnecté (barre = 0,2  $\mu\text{m}$ ).

## RÉFÉRENCES

13. Serafini T, Orci L, Amherdt M, Brunner M, Kahn RA, Rothman JE. ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. *Cell* 1991 ; 67 : 239-53.
14. Taylor TC, Kahn RA, Melancon RA. Two distinct members of the ADP-ribosylation factor family of GTP-binding proteins regulate cell-free intra-Golgi transport. *Cell* 1992 ; 70 : 69-79.
15. Donaldson JD, Finazzi D, Klausner RD, Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature* 1992 ; 360 : 350-2.
16. Bernd J, Rothman JE. Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature* 1992 ; 360 : 352-4.
17. Zeuzem S, Feick P, Zimmermann P, Haase W, Kahn RA, Schulz I. Intravesicular acidification correlates with binding of ADP-ribosylation factor to microsomal membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 6619-23.
18. Donaldson JD, Lippincott-Schwartz J, Bloom GS, Kreis TE, Klausner RD. Dissociation of a 110-kD peripheral membrane protein from the Golgi apparatus is an early event in brefeldin A action. *J Cell Biol* 1990 ; 111 : 2295-306.
19. Donaldson JD, Cassel D, Kahn RA, Klausner RD. ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein, is required for binding of the coatomer protein  $\beta$ -COP to Golgi membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 6408-12.
20. Kahn RA. Fluoride is not an activator of the smaller (20-25 kDa) GTP-binding proteins. *J Biol Chem* 1991 ; 266 : 15595-7.
21. Härri E, Loeffler W, Sigg HP, Stähelin H, Tamm C. Über die Isolierung neuer Stoffwechselprodukte aus *Penicillium brefeldianum* Dodge. *Helv Chim Acta* 1963 ; 46 : 1235-43.
22. Misumi Yo, Misumi Yu, Miki K, Takatsuki A, Tamura G, Ikehara Y. Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured hepatocytes. *J Biol Chem* 1986 ; 261 : 11398-403.
23. Cooper MS, Cornell-Bell AH, Chernjavsky A, Dani JW, Smith S. Tubulovesicular processes emerge from trans-Golgi cisternae, extend along microtubules, and interlink adjacent trans-Golgi elements into a reticulum. *Cell* 1990 ; 61 : 135-45.
- tomers dans le cytosol qui précède l'étape de fusion vésicule-compartiment accepteur [8]. Les résultats obtenus en système acellulaire laissent à penser qu'une protéine G trimérique du type  $G_s$  (stimulatrice) serait aussi présente. Ainsi l'addition d' $AlF_4^-$  à un mélange de membranes golgiennes et de cytosol induit la fixation de la  $\beta$ -COP sur les membranes. Cette fixation peut être inhibée par l'addition des sous-unités  $G_{\beta\gamma}$  au mélange réactionnel [9]. Le mastoparan, peptide connu pour activer les protéines G trimériques en mimant la propriété du récepteur de catalyser l'échange nucléotidique GDP/GTP, stimule également la fixation de la  $\beta$ -COP sur les membranes golgiennes [7].
- Les petites protéines G constituent une super-famille de plus de 30 protéines correspondant aux produits des gènes *rho*, *ral*, *rap*, *rab*, *rac*... chez les mammifères et de leurs homologues *SEC4*, *YPT1*, *SAR1*... chez la levure, qui ont toutes en commun des éléments de séquence avec  $p21^{ras}$  (pour revue, voir [10]). Ce sont des protéines monomériques (20-25 kDa) qui possèdent un groupement hydrophobe attaché à la cystéine en C-terminal pour se fixer à la membrane. Ce groupe est du type farnésyl ( $C_{15}$ ) dans le cas de  $p21^{ras}$  ou géranyl-géranyl ( $C_{20}$ ) dans le cas de Sec4p ou des protéines rab.
- Les ARF (*ADP-ribosylation factor*), identifiés à l'origine comme des cofacteurs nécessaires à l'ADP-ribosylation de la sous-unité  $G_{\alpha s}$  de l'adénylate cyclase en présence de la toxine cholérique, répondent aussi à la définition des petites protéines G. La famille ARF est divisée en trois classes dénommées classe I (ARF 1, 2 et 3), classe II (ARF 4 et 5), classe III (ARF 6) en fonction de leur poids moléculaire, de leur séquence aminopeptidique et de la structure de leur gène. Ces protéines sont ubiquitaires, hautement conservées et distribuées chez tous les eucaryotes. La famille ARF constitue une classe de petites protéines G distincte génétiquement de la classe ras/rab/YPT1. Ainsi, le domaine protéique porté par ARF, impliqué dans la fixation du GTP est davantage relié à celui des protéines G trimériques qu'à celui des petites protéines G du type ras [11]. Les protéines ARF sont des polypep-
- tides de 20-21 kDa qui diffèrent des autres petites protéines G par plusieurs points : (1) elles sont myristoylées sur la glycine N-terminale ; (2) elles présentent une plus grande affinité pour le GDP que pour le GTP ; (3) elles ne semblent pas avoir d'activité GTPase intrinsèque ; (4) elles sont plus hydrophiles.
- Le rôle joué par la protéine ARF 1 dans le contrôle des transports golgiens a été clairement démontré depuis qu'elle a été caractérisée comme le produit d'un gène essentiel à la sécrétion chez la levure [12], qu'elle est apparue comme une abondante protéine cytosolique capable de s'associer de façon réversible aux membranes golgiennes et qu'elle a été identifiée à la sous-unité de 21 kDa constitutive des coatomers des vésicules recouvertes [13]. Récemment, deux protéines appelées GGBF et GGBF\* (*GTP-dependent Golgi binding factor*) apparentées à ARF 1 ont été décrites. Elles assureraient la régulation des transports intragolgiens *in vitro* [14].
- La première étape dans la formation des vésicules recouvertes correspondrait à la formation d'ARF-GTP à partir du pool cytosolique d'ARF-GDP. Le changement de conformation d'ARF qui résulte de l'échange du GDP en GTP accroît son affinité pour les phospholipides et permet l'ancrage du groupement myristyl dans la membrane [13]. Cette réaction d'échange GDP/GTP correspondant à l'activation d'ARF a lieu au niveau de la membrane car : (1) ARF nécessite des phospholipides pour subir cette réaction ; (2) ARF est myristoylé, et cet acide gras est nécessaire à son action ; (3) le traitement préalable des membranes par la trypsine abolit toute fixation d'ARF ; (4) l'activité enzymatique responsable de l'échange nucléotidique GDP/GTP sur ARF correspondrait à une protéine membranaire golgienne [15, 16]. Cependant, les caractéristiques biochimiques de cette protéine restent à préciser. L'acidification du contenu intravésiculaire, par l'intermédiaire d'une pompe à protons membranaire dépendante de l'ATP-Mg<sup>2+</sup> favoriserait la formation d'ARF-GTP en agissant

\* Signal de rétention KDEL : séquence peptidique Lys-Asp-Glu-Leu de rétention dans les cisternes du réticulum endoplasmique.

probablement sur le facteur d'échange [17]. Inversement, la diminution de la concentration de l'ATP intracellulaire provoque la redistribution d'ARF et de la  $\beta$ -COP du Golgi vers le cytosol

[18]. Ces résultats suggèrent qu'une étape dépendant de l'ATP (pompe à protons, peut-être phosphorylation) est nécessaire à l'activation d'ARF. La pré-incubation des membranes

golgiennes en présence d'ARF et de  $GTP\gamma S$ , suivie de l'élimination par lavage d'ARF libre et du  $GTP\gamma S$  en excès, permet la fixation de la  $\beta$ -COP (et par extension des *coatomers*).

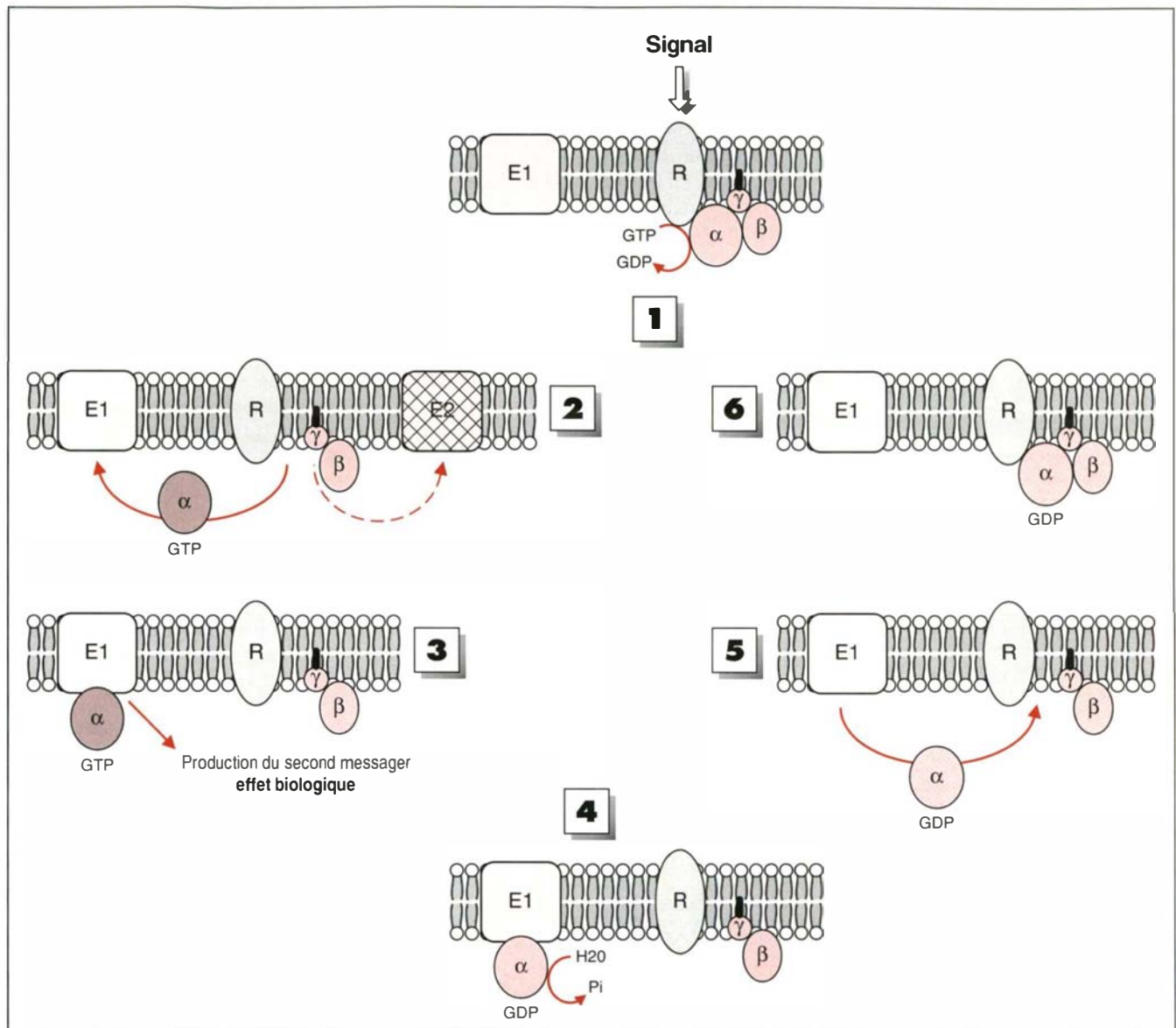


Figure 2. **Modèle d'action des protéines G trimériques.** Le récepteur transmembranaire R convertit le signal externe (fixation d'une hormone, action de la lumière...) en un changement conformationnel transmis au niveau de son domaine cytoplasmique. Le récepteur est alors dans un état excité, capable d'activer  $G_\alpha$  par une réaction d'échange GDP/GTP. L'hétérodimère  $G_{\beta\gamma}$  est responsable de l'ancrage de la protéine G à la membrane et permet la présentation de  $G_\alpha$ -GDP au récepteur (1). Cet échange nucléotidique provoque la dissociation de la protéine G en séparant  $G_\alpha$ -GTP de  $G_{\beta\gamma}$ .  $G_\alpha$ -GTP devenu cytosolique peut alors s'associer à son effecteur E1. Dans certains cas,  $G_{\beta\gamma}$  peut aussi interagir spécifiquement avec un effecteur E2 (2). L'interaction de  $G_\alpha$ -GTP avec E1 provoque la production du second messenger, lequel induit l'effet biologique (3). L'activité GTPase intrinsèque de  $G_\alpha$  hydrolyse le GTP en GDP + Pi (4). La vitesse de cette réaction détermine la durée de vie de la forme  $G_\alpha$ -GTP et de la réaction physiologique associée. L'ADP-ribosylation de  $G_{\alpha s}$ , catalysée par ARF et induite par la toxine cholérique, empêche la GTPase d'agir et maintient  $G_\alpha s$  sous forme active. L'hydrolyse du GTP en GDP permet la dissociation  $G_\alpha$ -GDP/effecteur (5). Le retour du système à l'état basal et la reconstitution de la protéine G trimérique est permise grâce à la haute affinité de  $G_\alpha$ -GDP pour  $G_{\beta\gamma}$  (6). L'ADP-ribosylation de  $G_{\alpha i/o}$ -GDP, provoquée par la toxine pertussique, inhibe la réassociation de  $G_\alpha$  avec  $G_{\beta\gamma}$ .

## RÉFÉRENCES

24. Fujiwara T, Oda K, Yokota S, Takatsuki A, Ikehara Y. Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1988 ; 263 : 18545-52.
25. Lippincott-Schwartz J, Yuan LC, Bonifacino JS, Klausner RD. Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A : evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell* 1989 ; 56 : 801-13.
26. Orci L, Tagaya M, Amherdt M, Perrelet A, Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J, Klausner RD, Rothman JE. Brefeldin A, a drug that blocks secretion, prevents the assembly of non-clathrin-coated buds on Golgi cisternae. *Cell* 1991 ; 64 : 1183-95.
27. Stryer L, Bourne HR. G proteins : a family of signal transducers. *Ann Rev Cell Biol* 1986 ; 2 : 391-419.
28. Lippincott-Schwartz J, Glickman J, Donaldson JG, Robbins J, Kreis TE, Seamon KB, Sheetz MP, Klausner RD. Forskolin inhibits and reverses the effects of brefeldin A on Golgi morphology by a cAMP-independent mechanism. *J Cell Biol* 1991 ; 112 : 567-77.
29. Semenza JC, Hardwick KG, Dean N, Pelham HRB. ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell* 1990 ; 61 : 1349-57.
30. Hsu VW, Shah N, Klausner RD. A brefeldin A-like phenotype is induced by the overexpression of a human ERD-2-like protein, ELP-1. *Cell* 1992 ; 69 : 625-35.
31. Giambianco I, Pula G, Ceccarelli P, Bianchi R, Donato R. Immunohistochemical localization of annexin V (CaBP33) in rat organs. *J Histochem Cytochem* 1991 ; 39 : 1189-98.
32. Gilman AG. G proteins : transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 1987 ; 56 : 615-49.
33. Sugai M, Chao-Hua C, Wu HC. Staphylococcal ADP-ribosyltransferase sensitive small G protein is involved in brefeldin A action. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 21297-9.
34. Pelham HRB. Multiple targets for brefeldin A. *Cell* 1991 ; 67 : 449-51.
35. Klausner RD, Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J. Brefeldin A : insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* 1992 ; 116 : 1071-80.

Des *coatomers* dépourvus d'ARF sont incapables de se fixer aux membranes en présence de GTP $\gamma$ S, à moins d'une addition d'ARF au milieu réactionnel. Enfin, le peptide N-terminal d'ARF non seulement inhibe la fixation d'ARF, mais inhibe également la fixation de la  $\beta$ -COP. Ces expériences démontrent clairement que la fixation membranaire d'ARF-GTP est un préalable nécessaire à celle des *coatomers* [19] (figure 3). Si les petites protéines G (dont ARF) sont comme les protéines G trimériques sensibles au GTP $\gamma$ S, elles sont, en revanche, résistantes au  $\text{AlF}_4^-$ . Cette propriété est particulièrement intéressante pour faire la distinction entre les deux types de protéines G [20]. La fixation séquentielle d'ARF et des *coatomers* sur les membranes induite par le GTP $\gamma$ S peut aussi être obtenue en présence d' $\text{AlF}_4^-$  et d'une quantité micromolaire de GTP [13, 19]. Cela suggère l'intervention d'une protéine G trimérique en amont de l'étape d'activation d'ARF. L'inhibition de la fixation d'ARF et des *coatomers* après incubation des membranes golgiennes et du cytosol en présence de la sous-unité  $G_{\beta\gamma}$ , avant toute addition de GTP $\gamma$ S, est en faveur d'une telle intervention [9]. Il est à noter que si l'ARF est associé aux vésicules recouvertes, il est absent des *coatomers* cytosoliques. La dissociation des *coatomers* nécessite donc une hydrolyse du GTP par l'intermédiaire d'une protéine GAP

(pour *GTPase activating protein*) spécifique d'ARF-GTP, située sur la membrane du compartiment accepteur, permettant ainsi le recyclage d'ARF-GDP dans le *pool* cytosolique. A ce jour, cette enzyme n'a pas encore été isolée.

## Action de la brefeldine A

La brefeldine A est une lactone hétérocyclique fongique isolée il y a trente ans à partir de *Penicillium brefeldianum* Dodge [21]. La brefeldine A fut de nouveau isolée en 1968 par une équipe japonaise. Dix-huit ans plus tard, la même équipe démontra l'action inhibitrice de la brefeldine A sur la sécrétion [22]. Cet article fut à l'origine de l'extraordinaire développement des recherches sur ce composé.

La brefeldine A provoque à 37 °C, dans les 30 à 60 secondes après le début du traitement des cellules, la dissociation réversible de la  $\beta$ -COP (et probablement des *coatomers*) des saccules golgiens, avant toute modification morphologique décelable de l'organite [18]. Le gonflement, suivi de la fragmentation, de l'appareil de Golgi avec redistribution de ses constituants vers le réticulum endoplasmique apparaît une à deux minutes plus tard. Ce mouvement rétrograde semble s'effectuer par l'intermédiaire de longues extensions tubulaires transitoires de 90 nm de diamètre le long des microtubules [23]. Ces structures tubulaires

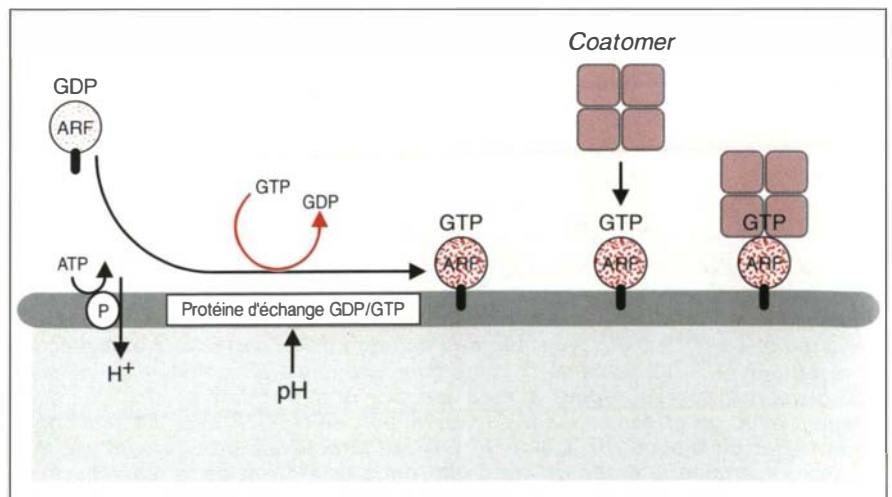


Figure 3. Étapes initiales de la formation des vésicules recouvertes golgiennes. Mise en évidence du rôle de ARF-GTP dans la fixation des coatomers sur la membrane.

disparaissent cinq minutes plus tard pour laisser place à un système réticulé Golgi-réticulum (*figure 1B*). D'un point de vue biochimique, ce système est caractérisé par une glycosylation anormale des protéines résidentes du réticulum et par une inhibition de la sécrétion [24, 25].

Tous les effets de la bréfeldine A observés sur cultures cellulaires sont totalement réversibles et ont pu être reproduits *in vitro*. La bréfeldine A inhibe la formation des vésicules recouvertes à partir de membranes golgiennes et favorise l'apparition d'extensions tubulaires qui connectent entre eux les saccules antérieurement indépendants. La formation de ce réseau nécessite de l'ATP et des protéines cytosoliques [26].

La  $\beta$ -COP n'est pas la cible d'action de la bréfeldine A. Celle-ci agit en amont pour provoquer non pas la déstabilisation des *coatomers* déjà fixés aux membranes, mais pour inhiber la fixation des *coatomers* du *pool* cytosolique sur les membranes golgiennes. L'interaction ARF-membrane est apparue correspondre à l'étape sensible à la bréfeldine A car la fixation membranaire d'ARF et des *coatomers* en présence de GTP $\gamma$ S est inhibée par la bréfeldine A. Ces deux composés agissent de façon antagoniste. Le GTP $\gamma$ S provoque la fixation irréversible et résistante à la bréfeldine A des *coatomers* sur les membranes, tandis que le pré-traitement par la bréfeldine A inhibe la formation des vésicules recouvertes, l'action de la bréfeldine A ne pouvant pas être levée par le GTP $\gamma$ S [27].

Ces résultats permettent de postuler que l'ARF et la bréfeldine A sont en compétition pour un même site membranaire [19]. Les travaux publiés simultanément par les équipes de R. Klausner et J. Rothman [15, 16] ont montré que la bréfeldine A inhibe l'échange nucléotidique GDP/GTP sur l'ARF. La bréfeldine A pourrait agir directement sur la protéine membranaire golgienne responsable de cet échange. Cependant, la démonstration définitive de cette interaction nécessitera la purification du facteur d'échange. La forskoline, connue depuis longtemps comme un puissant stimulateur de l'adénylate cyclase, inhibe et inverse l'action de la bréfeldine A selon un mécanisme indépen-

dant de l'AMP cyclique. En effet, des analogues de la forskoline (1, 9-didéoxy forskoline, 7-HPP-forskoline), qui sont incapables de stimuler l'adénylate cyclase, inversent l'action de la bréfeldine A [28]. La forskoline agirait comme un inhibiteur compétitif de la bréfeldine A, bien qu'il n'y ait pas de ressemblance chimique évidente entre ces deux composés. Cette propriété unique de la bréfeldine A d'exacerber la voie rétrograde (du Golgi vers le réticulum) a été astucieusement comparée à l'action de la protéine à sept hélices transmembranaires ELP-1/ERD-2, impliquée dans la récupération, au niveau du Golgi, des protéines porteuses de la séquence peptidique KDEL qui correspond au signal de rétention spécifique du réticulum [29]. La surexpression dans différents types cellulaires du gène codant pour cette protéine produit des effets phénotypiques indiscernables de ceux obtenus avec la bréfeldine A, tels que la redistribution de la  $\beta$ -COP du Golgi vers le cytosol, la « disparition » du Golgi et l'arrêt du transport antérograde. ELP-1/ERD-2 apparaît comme un bon candidat dans le rôle du récepteur membranaire, régulateur d'une protéine G trimérique impliquée dans le contrôle de l'étape précoce de formation des vésicules recouvertes golgiennes, décrite précédemment. Ainsi, après avoir fixé une protéine portant le signal KDEL, le récepteur ELP-1/ERD-2 inhiberait localement, par l'intermédiaire de  $G_i$ , la fixation des *coatomers*. En contrepartie, la formation des extensions tubulaires pour réexpédier le complexe protéine-récepteur vers le réticulum serait favorisée [30].

Par analogie avec le rôle des protéines G trimériques dans la transduction des signaux reçus par la membrane plasmique, l'implication de ces protéines G dans la régulation de la formation des vésicules sous-entend que des signaux internes au compartiment donneur initient le processus de transport. La séquence KDEL constitue un premier type de signal de contrôle de la voie de transport antérograde. Le degré de maturation et/ou de concentration des protéines destinées à être exportées pourrait constituer un second type de signal. Un modèle rassemblant l'ensemble de ces résultats est proposé (*figure 4*).

L'existence de protéines G trimériques stimulatrices et inhibitrices indique le haut degré de complexité de la régulation de la formation des vésicules recouvertes golgiennes.  $G_s$  semble être la forme dominante d'après les résultats obtenus après stimulation globale par le GTP $\gamma$ S ou AIF $_4^-$ . Un tel système régulateur a aussi été mis en évidence au niveau du TGN des cellules PC12 dans le contrôle de la formation des vésicules sécrétoires. En revanche, dans ce cas, la forme dominante semble être  $G_i/G_o$  [31].

La principale question posée par le modèle décrit sur la *figure 4* concerne la nature des interactions entre les protéines G trimériques et le contrôle du facteur d'échange nucléotidique relatif à l'ARF. L'existence dans les cellules PtK $_1$  résistantes à la bréfeldine A d'une sous-unité anormale  $G_\alpha$  de 39 kDa, absente de toutes les souches cellulaires sensibles à la drogue, semble indiquer non seulement que cette forme altérée de  $G_\alpha$  confère la résistance cellulaire à la bréfeldine A [7], mais aussi que  $G_\alpha$  (qui peut être en association avec le facteur d'échange) est une cible de la bréfeldine A. L'action d'AIF $_4^-$  sur l'augmentation de la fixation d'ARF et des *coatomers* sur la membrane golgienne peut s'expliquer par une stimulation de l'enzyme responsable de la réaction d'échange GDP/GTP sur l'ARF. Cette stimulation peut être directe si le facteur d'échange est une protéine G trimérique, ou indirecte si le facteur d'échange est un effecteur. Une autre hypothèse peut être l'augmentation de formation d'un complexe intermédiaire entre ARF-GDP et  $G_\alpha$ -GTP en préalable à la réaction d'échange. La mise en évidence de ce complexe au cours du processus de formation des vésicules (quoique le substrat de la toxine cholérique semble correspondre au complexe  $G_{\alpha s}$ -GDP/ARF.GTP [32]) serait un facteur déterminant dans l'identification des relations entre l'ARF et les protéines G trimériques (*figure 5*).

Des résultats récents semblent indiquer que l'ARF ne serait pas la seule petite protéine G impliquée dans le mode d'action de la bréfeldine A. Des cellules de rein de singe (cellules Vero) incubées en présence d'*epidermal cell differentiation inhibitor* (EDIN) — qui correspond à l'ADP-ribosyl-

## RÉFÉRENCES

36. Allan VJ, Kreis TE. A microtubule-binding protein associated with membranes of the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 1986 ; 103 : 2229-39.
37. Lippincott-Schwartz J, Yuan L, Tipper CM, Amherdt M, Orci L, Klausner RD. Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell* 1991 ; 67 : 601-16.
38. Wood SA, Park JE, Brown WJ. Brefeldin A causes a microtubule-mediated fusion of the trans-Golgi network and early endosomes. *Cell* 1991 ; 67 : 591-600.
39. Rosa P, Barr FA, Stinchcombe JC, Binacchi C, Huttner WB. Brefeldin A inhibits the formation of constitutive secretory vesicles and immature secretory granules from the trans-Golgi network. *Eur J Cell Biol* 1993 (sous presse).
40. Hendricks LC, McClanahan SL, Palade GE, Farquhar MG. Brefeldin A affects early events but does not affect late events along the exocytic pathway in pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 7242-6.
41. Hunzicker W, Whitney JA, Mellman I. Selective inhibition of transcytosis by brefeldin A in MDCK cells. *Cell* 1991 ; 67 : 617-27.
42. Prydz K, Hansen HH, Sandvig K, Van Deurs B. Effects of brefeldin A on endocytosis, transcytosis and transport to the Golgi complex in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* 1992 ; 119 : 259-72.
43. Damke H, Klumperman J, Von Figura K, Braulke T. Effects of brefeldin A on the endocytic route. *J Biol Chem* 1991 ; 266 : 24829-33.
44. Reaves B, Banting G. Perturbation of the morphology of the trans-Golgi network following brefeldin A treatment : redistribution of a TGN-specific integral membrane protein, TGN38. *J Cell Biol* 1992 ; 116 : 85-94.
45. Robinson MS, Kreis TE. Recruitment of coat proteins onto Golgi membranes in intact and permeabilized cells : effects of brefeldin A and G protein activators. *Cell* 1992 ; 69 : 129-38.
46. Miller SG, Carnell L, Moore HPH. Post-Golgi membrane traffic : brefeldin A inhibits export from distal Golgi compartments to the cell surface but not recycling. *J Cell Biol* 1992 ; 118 : 267-83.

\* Taxol : produit anticancéreux isolé de l'if.

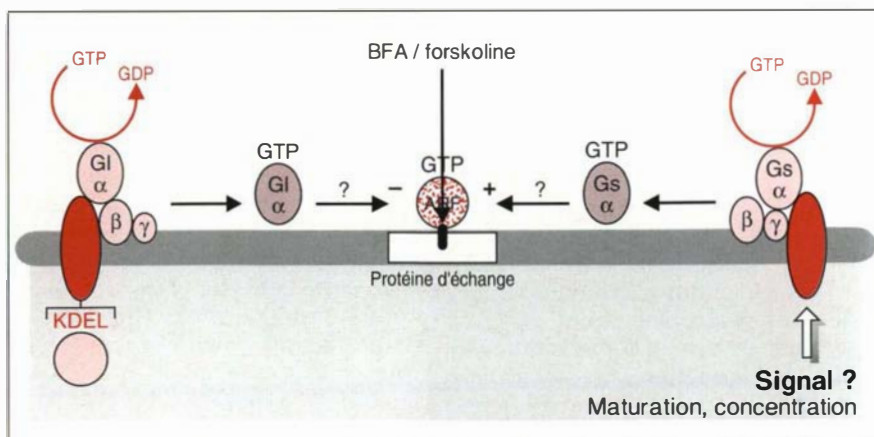


Figure 4. **Rôle des protéines G et site d'action de la brefeldine A dans l'étape initiale de formation des vésicules golgiennes. Modèle d'action des signaux intra-compartmentaux impliqués dans le contrôle de la formation des vésicules golgiennes. BFA : brefeldine A.**

transférase de *Staphylococcus aureus* — présentent des altérations analogues à celles induites par la brefeldine A (redistribution de la  $\beta$ -COP, désagrégation du Golgi). La redistribution de la  $\beta$ -COP induite par EDIN peut être inhibée par  $AlF_4^-$ . En revanche, EDIN n'inhibe pas la sécrétion mais provoque la dissociation des filaments d'actine. Il a été démontré qu'EDIN modifie la petite protéine G rho, probablement par l'intermédiaire de son facteur d'échange GTP/GDP. Enfin, l'étude comparative de trois souches cellulaires insensibles à la brefeldine A a montré que ces cellules sont résistantes à EDIN [33]. La relation entre rho, ARF et les protéines G trimériques n'a cependant pas encore été établie.

## Conclusion

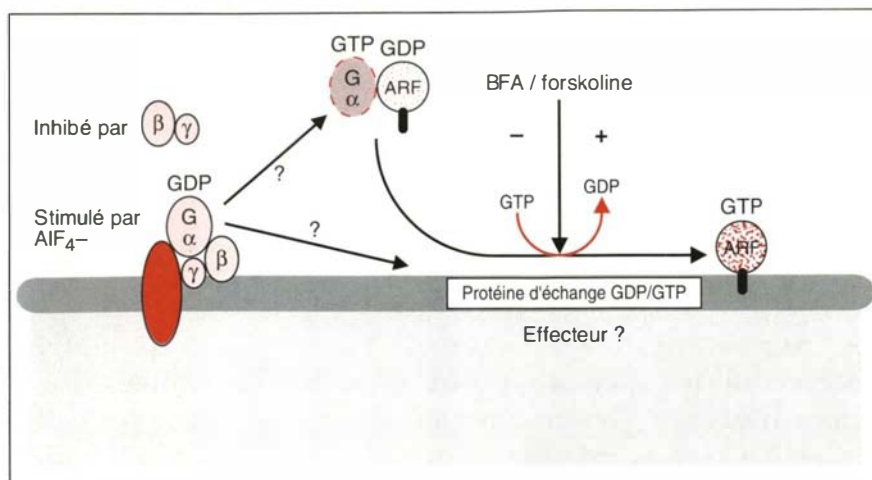
D'après le modèle proposé par H. Pelham [34], le manteau permet non seulement la formation des vésicules golgiennes en imposant une déformation de la membrane comme dans le cas de la clathrine, mais il assure également un masquage temporaire des sites d'attachement aux microtubules par l'intermédiaire de protéines-moteurs (dynéine cytoplasmique, kinésine...) pour donner le temps à la vésicule de se former. Une fois formée, la vésicule peut perdre son manteau, s'attacher à un microtubule et migrer vers sa destination. En empêchant la formation du manteau, la brefeldine A inhibe le processus de formation des vésicules tout en favo-

risant la formation de structures tubulaires qui constitueraient le mode de transport par défaut [34, 35]. La régulation de la fixation membranaire des *coat*ers permet donc d'ajuster l'équilibre entre le transport vésiculaire antérograde et le transport tubulaire rétrograde.

Le rôle des microtubules dans le maintien de l'intégrité de l'appareil de Golgi a été clairement montré par l'utilisation de produits qui dépolymérisent les microtubules, telles la colchicine et le nocodazole, et qui provoquent la fragmentation et la dispersion du Golgi. Ce phénomène est totalement réversible, et le Golgi fragmenté reste fonctionnel. Si la  $\beta$ -COP est associée aux membranes golgiennes, il ne faut pas perdre de vue que cette protéine a été originellement trouvée associée aux microtubules car, en présence de taxol\*, la  $\beta$ -COP cosédimente avec les microtubules polymérisés [36]. La relation  $\beta$ -COP-microtubules est difficile à replacer dans le modèle de Pelham, si l'on admet que la fixation des *coat*ers (la  $\beta$ -COP) sur les membranes masque temporairement des sites d'attachement aux microtubules. Des études complémentaires concernant l'action de la brefeldine A sur les interactions Golgi-microtubules seront nécessaires pour lever cette ambiguïté.

Il apparaît maintenant que la brefeldine A a de multiples cibles intracellulaires et qu'elle est capable de provoquer la formations de tubules à partir du système endosomique, du





## Summary

### Brefeldin A, G proteins and Golgi membrane transport

This review has attempted to provide a synthesis of the growing number of observations on the effects of the fungal metabolite brefeldin A. This drug dramatically alters the morphology of the Golgi complex and the return of Golgi markers to the endoplasmic reticulum. Intercisternal transport in the Golgi complex is mediated by non clathrin coated vesicles. The formation of these vesicles is dependent on the recruitment of a set of proteins from the cytosol, the coatomer. Brefeldin A blocks this step as demonstrated by the redistribution of  $\beta$ -COP, a component of coatomer, from Golgi to cytosol. In the absence of vesicle formation, Golgi cisternae tend to form tubules which are elongated along microtubules and rapidly fuse with the endoplasmic reticulum. Since all of these changes can be prevented by pretreating intact or permeabilized cells with  $\text{AlF}_4^-$  or  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  respectively (both of which are thought to act by locking G proteins in the active state), the potential role of trimeric G protein and small G protein has been investigated. Current data suggest that the assembly of cytosolic proteins on and off Golgi membranes is a process controlled in part by one or more membrane bound trimeric G proteins and by ARF small G protein family members. Binding of ARF to Golgi membranes is necessary before coatomer can bind these membranes, so the primary effect of BFA seems to be on the reaction responsible for ARF binding. The recent discovery that Golgi membrane can specifically catalyse the exchange of GTP onto ARF and that BFA prevents this function have confirmed this hypothesis.

Figure 5. **Relations hypothétiques entre les protéines G trimériques, l'activation de l'ARF et le site d'action de la brefeldine A.**  $\text{AlF}_4^-$  pourrait, soit stimuler le facteur d'échange GDP/GTP (directement si celui-ci est une protéine G trimérique, ou indirectement s'il est un effecteur), soit stimuler la formation d'un complexe intermédiaire entre ARF-GDP et  $\text{G}_\alpha$ -GTP en préalable à la réaction d'échange. BFA : brefeldine A.

TGN et des lysosomes [37], et d'induire la fusion du TGN avec des endosomes précoces pour produire un réseau tubulo-vésiculaire associé aux microtubules [38]. Si la brefeldine A inhibe la formation des vésicules sécrétoires constitutives et réglées à partir du TGN de cellules PC12 [39], en revanche elle n'inhibe pas la formation des grains de zymogène dans les cellules acineuses du pancréas [40]. Les résultats obtenus concernant les phénomènes de transcytose dans les cellules de rein de chien MDCK sont contradictoires. Dans un cas, la brefeldine A inhibe sélectivement la transcytose des IgA sans toutefois altérer l'appareil de Golgi [41]; dans un autre cas, la transcytose de la ricine ou de la peroxydase du raifort n'est pas perturbée [42]. La brefeldine A permet aussi de redistribuer le récepteur du mannose 6-phosphate/IGF-2 vers la surface cellulaire [43], de provoquer la redistribution des constituants du TGN à proximité du centre organisateur microtubulaire [44] et de la  $\gamma$ -adaptine associée aux vésicules à clathrine du TGN vers le cytosol [45]. En pratique, aucune donnée n'est encore disponible sur le mécanisme d'action de la brefeldine A sur ces diverses cibles non golgiennes. Finalement, l'action de la brefeldine A a permis de mettre en évidence deux grands systèmes circulatoires de membranes au sein de la cellule : le

bloc réticulum-Golgi et le bloc TGN-endosome-membrane plasmique. La théorie des blocs qui en découle implique que chaque bloc doit posséder son propre système de ciblage. Les transports entre les éléments d'un même bloc (trafic homotypique) se feraient par l'intermédiaire des tubules ou de vésicules lisses. Les vésicules recouvertes seraient employées lors des échanges entre éléments de blocs différents (trafic hétérotypique) [46].

Par analogie avec les protéines rab, les différentes protéines ARF associées à leurs facteurs d'échange (et aux éventuelles protéines GAP) pourraient contrôler un type particulier de transport intracellulaire en réglant l'assemblage de protéines de manteau, spécifiques de chacun de ces types de transport. Si cette séduisante hypothèse est de plus en plus souvent proposée, l'identité de ces différentes protéines de manteau reste à préciser ■

## Remerciements

L'auteur tient à remercier Michèle Ollivier-Bousquet pour ses photographies de microscopie électronique et pour ses critiques apportées lors de la rédaction de ce manuscrit, Françoise Lavialle et Eric Chanut pour leurs commentaires, et le Cnrs, l'Inra et l'Association pour la recherche sur le cancer (contrat n° 6866) pour leur soutien financier.