



subfamily A member) – un autre partenaire de Varp-, et la spectraplakine MACF1 (*microtubule-actin crosslinking factor 1*) – un effecteur de RAB21 – liant l'actine et les microtubules [10]. L'identification de ce réseau moléculaire trouve son origine dans les cribles des partenaires de TI-VAMP, de ceux de VARP et enfin de RAB21. Nous sommes ainsi allés jusqu'à 3 partenaires connectés en série, en aval de notre protéine d'intérêt grâce aux différents cribles en double hybride (TI-VAMP→VARP→RAB21→MACF1) (Figure 1). Évidemment, chacune des interactions a été validée par une approche biochimique et une analyse fonctionnelle. Nous montrons ainsi que ce réseau permet de transporter les vésicules TI-VAMP à la périphérie cellulaire le long des microtubules, assurant ainsi

la mise en place du phénomène d'exocytose. Ce travail démontre des liens biochimiques et fonctionnels forts entre des molécules centrales pour le trafic vésiculaire et offre une vue intégrée d'un processus de transport essentiel à la vie de cellules aussi diverses que des cellules épithéliales et neuronales. ♦

Molecular network for the transport of intracellular vesicles from cell center to periphery

LIENS D'INTÉRÊT

É. Formstecher déclare avoir des liens durables avec l'entreprise Hybrigenics.

A. Burgo et T. Galli déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Galli T, Martinez Arca S, Paumet F. Mécanisme de la fusion membranaire. *Med Sci (Paris)* 2002 ; 18 : 1113-9.
- Alcover A, Thoulouze Ml, Galli T. Recyclage polarisé et formation de la synapse immunitaire dans les lymphocytes T. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 9-10.
- Proux-Gillardeaux V, Galli T. Rôle du trafic membranaire dans la migration cellulaire : une nouvelle application pour les neurotoxines clostridiales ? *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 789-90.
- Zylbersztein K, Galli T. Le trafic membranaire, un nouvel acteur du guidage axonal. *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 267-9.
- Tareste D. Énergie libérée par la machinerie de fusion SNAREpin. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 142-3.
- Martinez-Arca S, Rudge R, Vacca M, et al. A dual mechanism controlling the localization and function of exocytic v-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 9011-6.
- Chaîneau M, Danglot L, Proux-Gillardeaux V, Galli T. Role of HRB in clathrin-dependent endocytosis. *J Biol Chem* 2008 ; 283 : 34365-73.
- Burgo A, Sotirakis E, Simmler MC, et al. Role of Varp, a Rab21 exchange factor and TI-VAMP/VAMP7 partner, in neurite growth. *EMBO Rep* 2009 ; 10 : 1117-24.
- Schäfer IB, Hesketh GG, Bright NA, et al. The binding of Varp to VAMP7 traps VAMP7 in a closed, fusogenically inactive conformation. *Nat Struct Mol Biol* 2012 ; 28 octobre (online). doi : 10.1038/nsmb.2414.
- Burgo A, Proux-Gillardeaux V, Sotirakis E, et al. A Molecular network for the transport of the TI-VAMP/VAMP7 vesicles from cell center to periphery. *Dev Cell* 2012 ; 23 : 166-80.

NOUVELLE

Rôle clé de la petite GTPase Rab5

De la biogenèse des endosomes au métabolisme du foie

Jérôme Gilleron, Anja Zeigerer, Giovanni Marsico, Thierry Galvez, Marino Zerial

Max Planck Institute of molecular cell biology and genetics, Pfotenhauerstrasse 108, 01307 Dresde, Allemagne. gilleron@mpi-cbg.de

> La cellule peut être considérée comme un système intégré de modules moléculaires contrôlant des fonctions telles que l'expression du génome, le trafic membranaire ou la signalisation cellulaire. Chaque cellule participe également de manière collective à la mise en place et au maintien du tissu auquel elle appartient. Cependant, à ce jour, prédire les conséquences d'une perturbation définie à l'échelle moléculaire sur les fonctions de l'organe et de l'organisme demeure un défi scientifique et médical qui, s'il était résolu, permettrait de mieux comprendre les mécanismes de pathogenèse et d'imaginer de nouvelles solutions thérapeutiques.

Rab5 : une protéine marqueur des endosomes précoces

À l'interface de plusieurs modules cellulaires, l'endocytose joue un rôle central dans le maintien de l'homéostasie cellulaire en contrôlant la composition de la membrane plasmique, l'internalisation de nutriments et la régulation de la signalisation cellulaire. Au cours de ce processus, des molécules de la surface cellulaire sont internalisées par invagination de la membrane plasmique avant de converger vers les endosomes précoces. Ces derniers ont un rôle clé, car ils constituent le centre de tri principal entre la voie de recyclage et la voie de dégradation (mettant en jeu les endosomes tardifs et les

lysosomes) [1]. Il est donc essentiel de déterminer les mécanismes moléculaires contrôlant l'assemblage, le nombre et la taille de ces organites (c'est-à-dire leur biogenèse), et de comprendre comment ces paramètres influencent l'homéostasie cellulaire et tissulaire. Au niveau moléculaire, les endosomes précoces sont définis par la présence de la petite GTPase Rab5 qui, par l'intermédiaire des effecteurs qu'elle recrute à la surface des endosomes, contrôle la fusion, la motilité et la maturation de ces organites [2]. Si la machinerie moléculaire associée à Rab5 a été suffisamment définie [3] pour permettre sa reconstitution à la surface d'endosomes de synthèse [4], son rôle

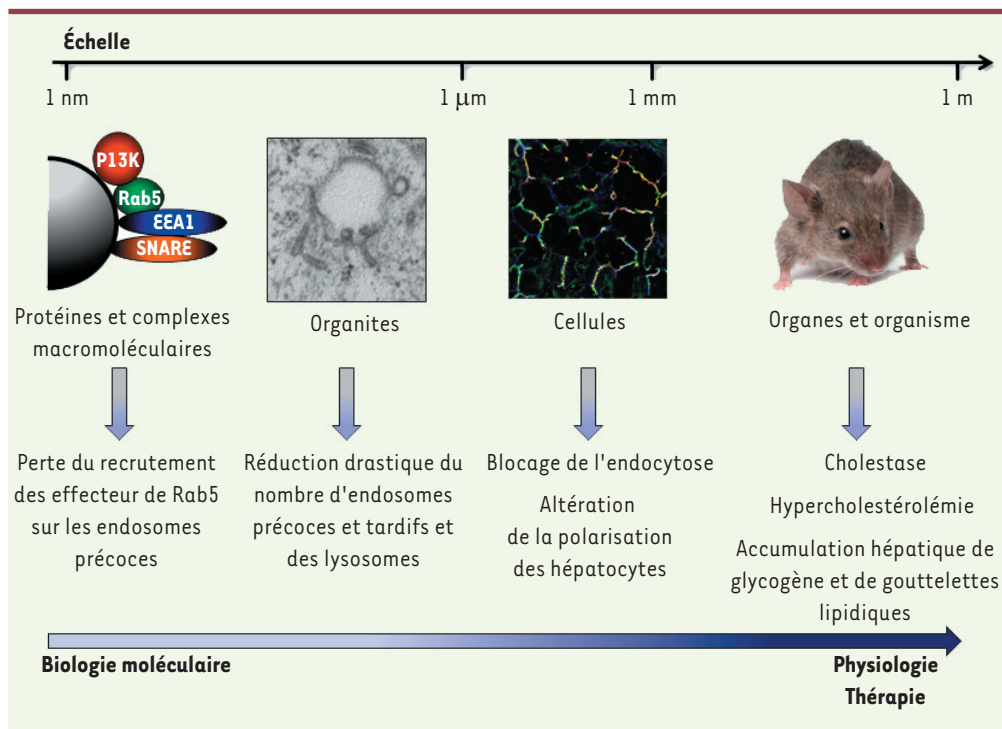


Figure 1. Représentation schématique de l'approche multi-échelles développée. L'approche multi-échelles permet de relier les différents modules du vivant en analysant les fonctions des protéines depuis la formation de complexes moléculaires jusqu'à la physiologie. Cette approche permet d'apprécier l'impact fonctionnel d'une protéine et d'intégrer l'ensemble des modifications moléculaires, structurales et métaboliques aboutissant à la pathologie. PI3K : phosphoinositide 3-kinase ; SNARE : soluble *N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor* ; EEA1 : *early endosome antigen-1*.

dans la biogenèse des endosomes *in vivo* reste inexploré. Afin d'évaluer l'importance fonctionnelle de Rab5 *in vivo*, nous avons utilisé une technologie récente qui permet de réduire l'expression de protéines hépatiques par injection intraveineuse de nanoparticules lipidiques contenant des petits ARN interférents (LNP-ARNi) [5]. Cette approche nous a permis de mettre en évidence un lien quantitatif entre l'expression de Rab5 et le nombre d'endosomes en titrant l'expression des trois isoformes de la protéine Rab5 (jusqu'à en réduire le taux d'environ 85 %) et en analysant les conséquences de cette perturbation au niveau des organites, de la cellule, de l'organe et de l'organisme [6]. Cette approche multi-échelles nous a permis, non seulement de démontrer le rôle essentiel de Rab5 dans la biogenèse du système endosomal, mais aussi de révéler les liens inattendus entre endosomes, polarité cellulaire et métabolisme hépatique (Figure 1).

Rab5 est nécessaire à la biogenèse des endosomes

De manière surprenante, trois jours après l'injection des LNP-ARNi, alors

que le niveau des protéines hépatiques est réduit de 50 %, aucun changement notable du système endosomal n'a pu être observé, ce qui souligne la robustesse de ce système face à des modifications de la concentration de Rab5. Néanmoins, cinq jours après injection des LNP-ARNi, lorsque le niveau des protéines hépatiques s'abaisse au-dessous du seuil de 50 %, le système s'effondre. Ainsi, au niveau moléculaire, la protéine EEA1 (*early endosome antigen-1*), un des effecteurs de Rab5 qui joue un rôle clé dans l'arrimage des endosomes avant leur fusion [3], n'est plus associée aux membranes intracellulaires. Ceci confirme le rôle de Rab5 dans l'assemblage des complexes macromoléculaires à la surface des endosomes précoces. Au niveau des organites d'endocytose, une chute drastique du nombre des endosomes précoces et tardifs, ainsi que des lysosomes, a été observée. Ces résultats sont remarquables car ils démontrent, d'une part, que Rab5 est nécessaire à la biogenèse des endosomes précoces et, d'autre part, que ces endosomes précoces constituent la source majeure de matériel pour les endosomes tardifs

et les lysosomes dans le tissu hépatique (Figure 2).

L'endocytose est essentielle au maintien de la polarité des hépatocytes

La génération d'hépatocytes contenant un nombre très réduit d'endosomes nous a permis d'appréhender le rôle de ces organites dans des fonctions cellulaires plus intégrées, telles que le maintien de la polarité cellulaire et de l'intégrité tissulaire *in vivo*. Les hépatocytes sont des cellules polarisées constituées d'une membrane plasmique basale en contact avec les vaisseaux sanguins, et d'une membrane plasmique apicale formant les canalicules biliaires entre les hépatocytes (Figure 2). Ses fonctions d'endocytose et d'adressage prédisposent le système endocytique à jouer un rôle essentiel dans le maintien de la polarité cellulaire. Cependant, la majorité des études sur l'adressage des protéines membranaires dans les cellules polarisées ont été effectuées dans des modèles de cellules en culture, très éloignés des conditions physiologiques. Le côté artificiel de l'approche expérimentale

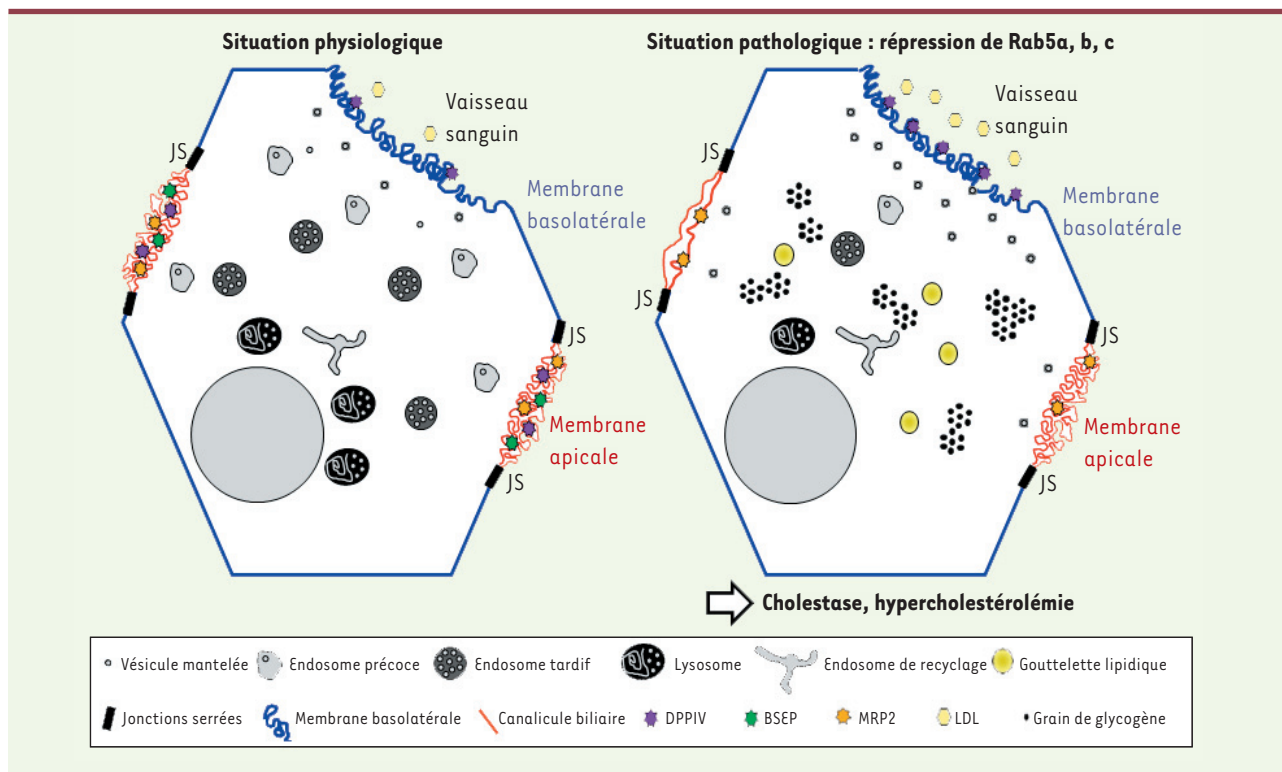


Figure 2. Effets de la diminution d'expression transitoire de Rab5 dans les hépatocytes. Les hépatocytes sont des cellules polarisées composées de membranes basolatérales (bleu) et de membranes apicales (rouge) séparées par des jonctions serrées (JS). La membrane basale, en interaction avec les cellules endothéliales, permet les échanges bidirectionnels entre le sang et les hépatocytes. La membrane apicale permet la sécrétion des acides biliaires. Lors de la répression de l'expression de Rab5, le nombre d'endosomes et de lysosomes est fortement réduit, ce qui conduit à une baisse de l'endocytose des LDL et une baisse de l'adressage des protéines BSEP et DPPIV à la membrane apicale. De plus, une augmentation inattendue du nombre de gouttelettes lipidiques et de grains de glycogène a été observée parallèlement. Ces altérations cellulaires engendrent une cholestase hépatique et une hypercholestérolémie au niveau de l'organisme.

tale *in vitro* a engendré de nombreuses controverses que, pour certaines d'entre elles, l'ablation du système endolysosomal *in vivo*, que nous avons mise au point, nous a permis de résoudre. Ainsi, nous avons pu démontrer que la protéine MRP2 (*multidrug resistance protein 2*) ne requiert pas d'intermédiaire endosomal pour être adressée à la membrane apicale, à l'inverse de ce qui fut proposé précédemment [7]. En effet, MRP2 est dirigée directement au pôle apical par la voie de biosynthèse et de sécrétion cellulaire [8]. Au contraire, un adressage correct des deux protéines apicales, DPPIV (dipeptidyl peptidase-4) et BSEP (pompe d'export des sels biliaires), nécessite la présence de la voie endolysosomale (Figure 2), démontrant le rôle majeur des endosomes dans l'adressage

des protéines et dans le maintien de la polarité cellulaire au niveau des hépatocytes.

La suppression transitoire de l'expression de Rab5 dans le foie induit une pathologie métabolique sévère

Le foie est un organe vital dont les fonctions métaboliques sont au cœur du contrôle de la glycémie, de la cholestérolémie et de la production des acides biliaires. Comme attendu, la suppression de l'expression de Rab5 réduit fortement l'endocytose des lipoprotéines de faible densité (LDL), ce qui se traduit au niveau de l'organisme par une hypercholestérolémie (taux de cholestérol environ 10 fois supérieur au taux normal). De plus, la perturbation de la

polarité des hépatocytes, notamment le problème d'adressage de BSEP, engendre une situation de cholestase. Par ailleurs, de façon complètement inattendue, les hépatocytes dépourvus de Rab5 présentent, même après plusieurs heures de jeûne, un nombre élevé de grains de glycogène et de gouttelettes lipidiques (Figure 2). Ces résultats suggèrent un dérèglement sévère des fonctions métaboliques régulant la glycémie et la lipémie, dont les mécanismes restent à élucider.

Conclusions et perspectives

Notre étude démontre que (1) Rab5 est nécessaire à la biogenèse des endosomes, (2) les endosomes participent au maintien la polarité des hépatocytes, (notamment par leur rôle dans

l'adressage des protéines), et (3) les endosomes sont nécessaires à l'exécution normale des fonctions métaboliques hépatiques. Cette approche multi-échelles nous a permis de proposer un lien causal entre ces trois résultats, ainsi que de mettre en évidence des résultats inattendus, tels que le lien entre endocytose et fonctions métaboliques hépatiques. Cette dernière observation est à rapprocher des résultats récents issus du criblage à haut débit du génome humain sur les fonctions endocytiques qui révèle que 13 % des protéines régulant l'endocytose ont des fonctions métaboliques [9], mettant en évidence un mécanisme de régulation réciproque.

De façon plus générale, l'analyse des mécanismes par une approche multi-échelles permet d'intégrer la fonc-

tion des modules cellulaires dans leur contexte physiologique au sein des tissus, de l'organe et de l'organisme. Par exemple, nos résultats suggèrent que l'altération de la voie de l'endocytose peut être à l'origine de certaines pathologies métaboliques hépatiques. De plus, la technologie que nous avons utilisée pour inhiber l'expression des trois isoformes de Rab5 pourrait être employée à des fins thérapeutiques pour réduire l'expression de protéines cibles dans certaines pathologies du foie, telles que le diabète ou l'hypercholestérolémie. ♦

Key role of Rab5: from endosome biogenesis to liver metabolism

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Platta HW, Stenmark H. Endocytosis and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2011 ; 23 : 393-403.
2. Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 ; 2 : 107-17.
3. Christoforidis S, McBride HM, Burgoyne RD, Zerial M. The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* 1999 ; 397 : 621-5.
4. Ohya T, Miaczynska M, Coskun U, et al. Reconstitution of Rab- and SNARE-dependent membrane fusion by synthetic endosomes. *Nature* 2009 ; 459 : 1091-7.
5. Akinc A, Querbes W, De S, et al. Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms. *Mol Ther* 2010 ; 18 : 1357-64.
6. Zeigerer A, Gilleron J, Bogorad RL, et al. Rab5 is necessary for the biogenesis of the endolysosomal system *in vivo*. *Nature* 2012 ; 485 : 465-70.
7. Wang L, Boyer JL. The maintenance and generation of membrane polarity in hepatocytes. *Hepatology* 2004 ; 39 : 892-9.
8. Wakabayashi Y, Dutt P, Lippincott-Schwartz J, Arias IM. Rab11a and myosin Vb are required for bile canalicular formation in WIF-B9 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ; 102 : 15087-92.
9. Collinet C, Stoter M, Bradshaw CR, et al. Systems survey of endocytosis by multiparametric image analysis. *Nature* 2010 ; 464 : 243-9.

NOUVELLE

Comment les interneurons perdent la cadence dans le cerveau des souris modèles d'Alzheimer

Laure Verret^{1,2}

¹Gladstone Institute of Neurological Disease, San Francisco, États-Unis ;

²Department of Neurology, University of California, 1650 Owens Street, San Francisco, CA 94158, États-Unis. laure.verret@gladstone.ucsf.edu

► La maladie d'Alzheimer est une maladie dégénérative du système nerveux central qui a pour conséquences de graves troubles du comportement et de la mémoire. Outre son aspect dramatique pour les personnes atteintes ainsi que pour leurs proches, cette pathologie constitue un problème majeur de santé publique. Or, il n'existe à ce jour ni traitements ni soins préventifs efficaces contre la maladie d'Alzheimer, et sa prévalence ne cesse d'augmenter parallèlement au vieillissement global de la population mondiale et à l'allongement de l'espérance de vie. On estime à plus de 30 millions le nombre

de personnes souffrant de cette maladie dans le monde en 2012.

Peptides β -amyloïde, hypersynchronie cérébrale et activités épileptiques

Nous savons aujourd'hui que la présence des peptides β -amyloïdes ($A\beta$) joue un rôle crucial dans la pathologie d'Alzheimer [1]. Jusqu'à récemment, les efforts de recherche se sont essentiellement concentrés sur l'étude des effets néfastes des peptides $A\beta$ sur le fonctionnement des neurones ou des synapses. Ainsi, au niveau synaptique, le niveau anormalement élevé des peptides $A\beta$ provoque une dépression de l'activité

des synapses excitatrices ainsi qu'une détérioration de leur plasticité [2, 3]. Cependant, l'impact des peptides $A\beta$ sur de grandes assemblées de neurones, ainsi que sur l'activité cérébrale globale, reste largement incompris, tant chez l'homme que chez les modèles animaux. Des études récentes ont néanmoins développé l'idée que la présence des peptides $A\beta$ perturbe le fonctionnement cérébral bien au-delà de la synapse et, qu'en réciproque, l'accumulation des peptides $A\beta$ serait accélérée par l'activité neuronale. Ainsi, chez les patients Alzheimer comme les sujets âgés non déments, les dépôts de peptides $A\beta$