

La clathrine est-elle superflue pour l'endocytose non spécifique ?

Philippe Cupers
Alex Veithen
Pierre J. Courtoy

L'inhibition de la polymérisation de la clathrine sous la membrane plasmique ralentit d'environ dix fois l'endocytose de transferrine liée à son récepteur, mais n'a pas d'effet sur l'endocytose non spécifique de fluide et de membrane. De plus, les vésicules d'endocytose primaires, identifiées par cytochimie ultrastructurale, ont la même taille dans les cellules traitées et les cellules témoins. Deux interprétations sont proposées. La plus provocante est que la clathrine ne joue aucun rôle dans la formation des vésicules d'endocytose primaires des cellules témoins et se limite à y recruter les récepteurs dont l'endocytose est accélérée. La seconde est que l'inhibition de la polymérisation de la clathrine dans les cellules traitées y démasque une machine moléculaire accessoire, qui ne participe pas à l'endocytose dans les cellules témoins. Dans les deux cas, une nouvelle machine moléculaire de l'endocytose reste à identifier.

Une caractéristique centrale de la matière vivante est la délimitation de compartiments aqueux par des membranes lipidiques [1]. Cette compartimentation atteint un niveau de complexité remarquable dans les cellules eucaryotes. La communication par échanges macromoléculaires entre les divers compartiments de l'appareil endocytaire et de l'appareil sécrétoire implique un intense trafic vésiculaire, dont la machine moléculaire fait l'objet de recherches très actives. Il apparaît que les mêmes principes gouvernent les deux types d'appareils, et que la machine moléculaire qui les sous-tend est largement conservée au cours de l'évolution. Les informations

recueillies dans un système particulier sont donc susceptibles d'éclairer l'ensemble de ce trafic.

Dans ce contexte, la formation de vésicules endocytaires primaires* constitue un système expérimental de choix. En effet, au contraire de la phagocytose qui ne nous intéressera pas ici, l'endocytose est un phénomène constitutif permanent durant

ADRESSE

Ph. Cupers: *chercheur post-doctoral*; A. Veithen: *chercheur pré-doctoral*; P.J. Courtoy: *professeur à l'université de Louvain*. Unité de biologie cellulaire, Louvain university medical school et International institute of cellular and molecular pathology, 75, avenue Hippocrate, B-1200 Bruxelles, Belgique.

* Au sens large, l'endocytose définit la capture vésiculaire et le ciblage intracellulaire de macromolécules en solution (pinocytose) ou de particules (phagocytose). Nous utiliserons ici le terme « endocytose » dans son acception la plus restreinte, à savoir l'étape d'entrée de macromolécules dans la cellule, qui correspond à la formation d'une vésicule endocytaire primaire par invagination de la membrane plasmique.

RÉFÉRENCES

1. Maddox J. Origin of the first cell membrane? *Nature* 1994; 371: 101.
2. Courtoy PJ, ed. Endocytosis. From cell biology to health, disease and therapy. *NATO ASI Series. Series H: Cell Biology* 1990; 62: 523.
3. Pauloin A. Vésicules recouvertes, polypeptides d'assemblage et phosphorylation. *médecine/sciences* 1991; 7: 561-8.
4. Watts C, Marsh M. Endocytosis: what goes in and how? *J Cell Sci* 1992; 103: 1-8.
5. Shyng SL, Heuser JE, Harris DA. A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J Cell Biol* 1994; 125: 1239-50.
6. Mayor S, Rothberg KG, Maxfield FR. Sequestration of GPI-anchored proteins in caveolae triggered by cross-linking. *Science* 1994; 264: 1948-51.
7. Heuser J, Evans L. Three-dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts. *J Cell Biol* 1980; 84: 560-83.
8. Schlossman DM, Schmid SL, Braell WA, Rothman JE. An enzyme that removes clathrin coats: purification of an uncoating ATPase. *J Cell Biol* 1984; 99: 722-33.
9. Marsh M, Helenius A. Adsorptive endocytosis of Semliki Forest Virus. *J Mol Biol* 1980; 142: 439-54.
10. Sandoval IV, Bakke O. Targeting of membrane proteins to endosomes and lysosomes. *Trends Cell Biol* 1994; 4: 292-7.
11. Robinson MS. The role of clathrin, adaptors, and dynamin in endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6: 538-44.
12. Coppens I, Oppenheimer FR, Courtoy PJ, Baudhuin P. Receptor-mediated endocytosis in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *J Protozool* 1987; 34: 465-73.
13. Tan PK, Davis NG, Sprague GF, Payne GS. Clathrin facilitates the internalization of seven transmembrane segment receptors for mating pheromones in yeast. *J Cell Biol* 1993; 123: 1707-16.
14. Rath S, Rohrer J, Crausaz F, Riezman H. End3 and end4: two mutants defective in receptor-mediated and fluid-phase endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 1993; 120: 55-65.

l'interphase de toutes les cellules eucaryotes. Son ampleur est considérable: on peut estimer qu'une cellule « moyenne » capte par endocytose l'équivalent de son volume chaque jour et intériorise l'équivalent de sa surface chaque heure. L'étude expérimentale en est particulièrement commode, car l'accès des traceurs endocytaires est immédiat et on peut recourir à plusieurs types de perturbations empiriques capables de moduler l'activité endocytair. Plusieurs molécules auxquelles un rôle important a été attribué dans l'endocytose sont bien caractérisées et l'effet de mutations critiques de leur gène peut être précisé. Enfin, il n'est pas inutile de rappeler l'importance considérable de l'endocytose en physiologie, en pathologie et en thérapeutique, voire dans la transition entre eucaryotes et procaryotes au cours de l'évolution [2].

La formation d'une vésicule endocytair primaire implique nécessairement la séquestration d'une gouttelette du liquide extracellulaire. On appelle endocytose fluide la pénétration des molécules qui y sont en solution. La membrane qui délimite cette vésicule comprend la double couche lipidique et des protéines de la membrane plasmique. Les traceurs qui se lient à ces constituants membranaires de manière non spécifique sont internalisés par endocytose adsorptive. Dans l'endocytose liée aux récepteurs, certaines protéines transmembranaires et leurs ligands spécifiques peuvent être sélectivement rassemblés dans les invaginations endocytaires tapissées de clathrine, appelées *coated pits* ou « puits mantelés » [3]. Les complexes ligand-récepteur y sont concentrés environ dix fois par rapport au reste de la membrane plasmique et leur endocytose en est accélérée d'autant [4]. Il convient de rappeler qu'il s'agit là de modalités pour la pénétration de molécules, n'impliquant pas nécessairement des structures subcellulaires distinctes. Il semble d'ailleurs que pratiquement toutes les protéines de la membrane plasmique puissent être détectées dans les puits mantelés, y compris diverses protéines dont l'ancrage se limite à un lien glycophosphatidylinositol [5, 6].

La concentration des complexes ligand-récepteur dans les puits man-

telés y a facilité leur localisation ultrastructurale, tout en attirant l'attention sur le réseau de clathrine. La capacité de la clathrine de former un réseau polygonal dynamique capable d'incurvation [7], et son association à une activité ATPasique [8] ont fait naître l'idée que le réarrangement de la clathrine constituait un moteur de l'endocytose. De plus, on a pu estimer que l'entrée d'un virus par les puits mantelés entraînait une réduction de l'endocytose fluide, compatible avec le degré d'occupation des puits par les virus [9]. Le paradigme selon lequel toute l'endocytose était dépendante de la clathrine s'est donc établi, et c'est ce paradigme qui sera mis en question ici.

L'endocytose associée à la clathrine

La clathrine est un hexamère (~650 kDa) constitué de 3 chaînes lourdes et de 3 chaînes légères, qui s'assemblent spontanément en triskélions [3]. Ceux-ci se disposent sur le versant cytoplasmique de la membrane plasmique et du réseau transgolgien (*trans-Golgi network*) en un grillage plan à base d'hexagones. Lors de l'invagination de la membrane conduisant à la formation d'un puits mantelé, le réseau des triskélions s'incurve par réorganisation partielle en pentagones et heptagones. La clathrine est reliée au domaine cytoplasmique de nombreux récepteurs de protéines et de quelques autres protéines transmembranaires par des complexes d'assemblage ou adaptines (AP2 sous la membrane plasmique, AP1 sur les bourgeons transgolgiens) [10, 11]. Après leur formation, les vésicules perdent rapidement leur manteau de clathrine, sous l'effet d'une ATPase dépolymérisante de 70 kDa, apparentée aux protéines de choc thermique (*uncoating ATPase* [8]).

On estime que les cellules des mammifères possèdent au repos entre 1 000 et 3 000 invaginations et vésicules endocytaires recouvertes de clathrine [3], dont le diamètre varie entre 90 et 300 nm. Le pourcentage de la membrane plasmique recouverte de clathrine a été estimé à ~2 % [3]. L'endocytose liée aux récepteurs existe déjà chez des unicellulaires tels les trypanosomes [12], les levures

[13, 14] et les amibes [15, 16]. La concentration des récepteurs dans les puits mantelés est responsable de leur endocytose particulièrement efficace; à l'inverse, la délétion du domaine cytoplasmique du récepteur de la transferrine, dont l'interaction avec le système AP2/clathrine assure la concentration sélective dans les puits mantelés, en ramène la vitesse d'endocytose à celle des constituants non spécifiques de la membrane plasmique (*bulk [-flow] endocytosis* [4]). Au niveau du réseau transgolgien, les puits mantelés sont impliqués dans le transport sélectif des enzymes lysosomiales nouvellement synthétisées vers les endosomes [17].

L'endocytose indépendante de la clathrine

Une série d'observations morphologiques, biochimiques et génétiques ont été présentées en faveur de l'existence d'une activité endocyttaire indépendante de la clathrine [18]. En microscopie électronique, certains ligands telles la toxine du choléra et la toxine du tétanos, adsorbées sur des particules d'or colloïdal, paraissent se rassembler préférentiellement sur la membrane plasmique dans de petites invaginations (~50 nm de diamètre), non recouvertes de clathrine, et appelées cavéoles (*caveolae*; figure 1 (4)). Les toxines seraient intégrées par endocytose au niveau de ces invaginations et transférées dans les endosomes, où convergent également les constituants endocytés par la voie dépendante de la clathrine [19]. Cependant, cette interprétation doit être considérée avec prudence, parce que la formation de vésicules endocytaires primaires individuelles à partir des cavéoles n'a jamais été démontrée [18]. Celles-ci seraient impliquées dans un mécanisme hypothétique appelé potocytose, qui repose sur un concept distinct de l'endocytose [20]. En outre, les mêmes toxines peuvent être détectées par immunomarquage dans les puits mantelés [21].

Par ailleurs, dans les cellules HEp2, le diamètre moyen des profils des vésicules endocytaires primaires non recouvertes de clathrine (95 nm) apparaît légèrement mais significativement inférieur à celui des vésicules

endocytaires recouvertes de clathrine (110 nm) [22]. On ne peut cependant exclure que cette faible différence puisse résulter d'une rétraction inégale sous l'effet du fixateur hypertonique, les vésicules mantelées étant stabilisées par leur treillis de clathrine. La rigidité de ce réseau prévient en effet la déformation de leur membrane sous l'effet de la filipine [23].

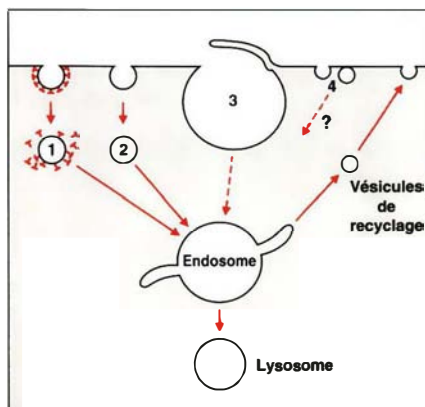


Figure 1. **Les diverses structures proposées pour l'endocytose:** (1) puits mantelé; la dépolymérisation de la clathrine sur la vésicule mantelée produit une vésicule « nue »; (2) invagination endocyttaire primaire dépourvue de clathrine, de taille comparable à celle des puits mantelés [22]; (3) formation d'une vacuole de macropinocytose; (4) cavéoles, l'une ouverte, l'autre fermée; leur participation à l'endocytose est douteuse [18]. Les constituants intériorisés par les différentes voies d'entrée endocytaires peuvent converger dans les endosomes tubulo-sphériques, d'où ils peuvent être reconduits à la surface par des tubules étroits ou de petites vésicules (recyclage de membrane et de récepteurs, régurgitation de fluide), ou être transférés aux lysosomes.

L'effet discordant de diverses manipulations expérimentales sur l'endocytose fluide et l'endocytose par récepteurs a été également interprété comme indiquant l'existence d'une voie non associée à la clathrine. C'est ainsi que l'endocytose fluide peut être stimulée de 2 à 10 fois par des facteurs de croissance, des esters de phorbol, ou des protéines

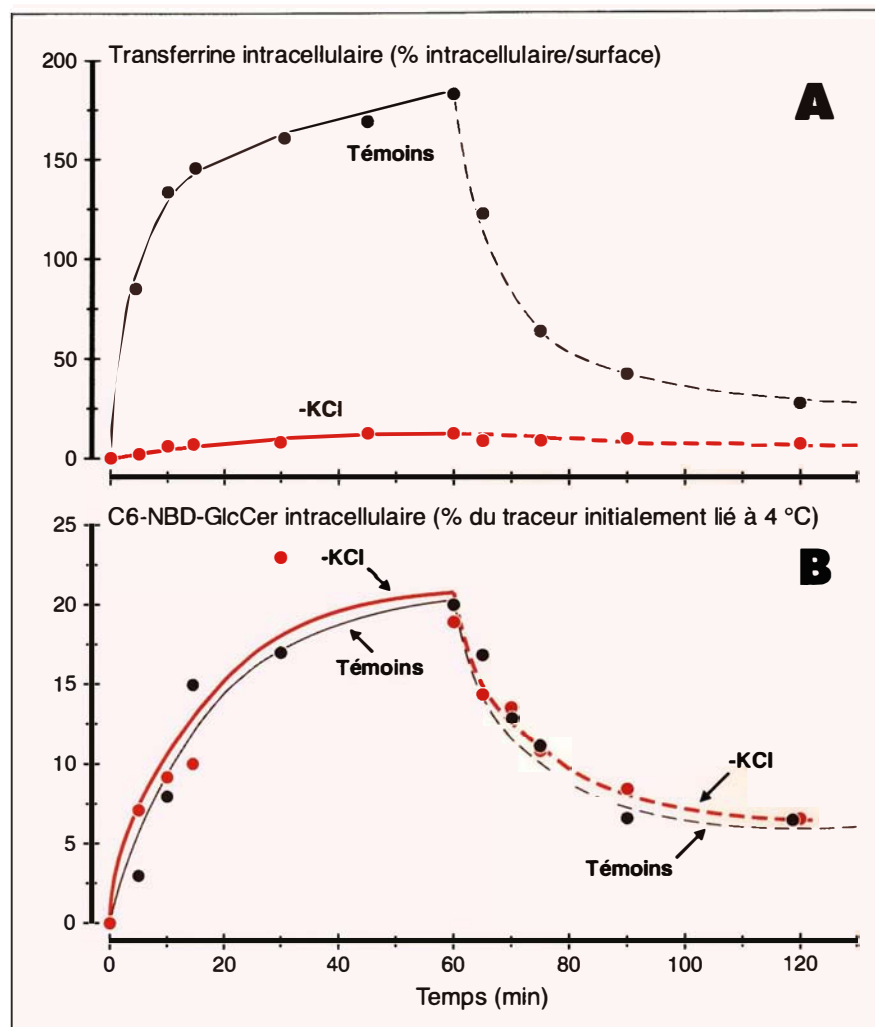
oncogéniques [18]. Cette stimulation s'accompagne d'une augmentation des mouvements membranaires à type de *ruffling* (constitution de rides, d'ondulations), mais n'affecte pas l'endocytose associée à la clathrine [24]. Elle résulte, en fait, d'une induction de la macropinocytose, forme particulière d'endocytose impliquant de grosses vésicules endocytaires primaires, souvent recouvertes d'actine [25]. Dans les cellules épithéliales polarisées MDCK, l'activation des protéines G hétérotrimériques et l'augmentation de la concentration en AMPc qui en résulte stimulent l'endocytose non spécifique du côté apical, alors que l'endocytose de transferrine serait, quant à elle, inhibée [26].

En outre, des perturbations empiriques rapides et réversibles, telles que la déplétion du potassium intracellulaire [27], l'incubation en milieu hypertonique [28] et l'acidification du cytosol [29], inhibent la polymérisation de la clathrine sous la membrane plasmique et donc la formation des puits mantelés [27, 28], ou paralysent leur fermeture en vésicules mantelées [29]. Cela se traduit par une inhibition équivalente de l'endocytose rapide de ligands qui s'y concentrent comme la transferrine, alors que l'accumulation intracellulaire de traceurs de l'endocytose fluide n'est que partiellement diminuée. Enfin, il existe des mutants de fibroblastes où l'endocytose fluide est diminuée de moitié, sans que l'endocytose par récepteurs soit affectée [30, 31]. Par ailleurs, l'inactivation par mutation du gène de la chaîne lourde de la clathrine chez *Saccharomyces cerevisiae* réduit de moitié l'intériorisation du facteur α [13] tandis que l'endocytose non spécifique de membrane n'est guère affectée [32]. L'interprétation des effets de la suppression de la clathrine par des ARN messagers antisens sur l'endocytose fluide chez *Dictyostelium discoideum* est moins claire [15]. Ces perturbations et mutations suggèrent fortement l'existence d'une machine moléculaire endocyttaire, distincte de la clathrine.

Nous avons analysé l'endocytose indépendante de la clathrine dans des fibroblastes fœtaux de rat en culture primaire, en utilisant deux perturbations empiriques décrites plus

RÉFÉRENCES

15. Ruscetti T, Cardelli JA, Niswonger ML, O'Halloran TJ. Clathrin heavy chain functions in sorting and secretion of lysosomal enzymes in *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Biol* 1994; 126: 343-52.
16. Bacon RA, Cohen CJ, Lewin DA, Mellman I. *Dictyostelium discoideum* mutants with temperature-sensitive defects in endocytosis. *J Cell Biol* 1994; 127: 387-99.
17. Meresse S, Bauer U, Ludwig T, Mauxion F, Schmidt A, Hoflack B. Bases moléculaires du transport vers les lysosomes. *médecine/sciences* 1993; 9: 148-56.
18. Sandvig K, Van Deurs B. Endocytosis without clathrin. *Trends Cell Biol* 1994; 4: 275-7.
19. Tran D, Carpentier JL, Sawano F, Gordon P, Orci L. Ligands internalized through coated or noncoated invaginations follow a common intracellular pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7957-61.
20. Anderson RGW. Potocytosis of small molecules and ions by caveolae. *Trends Cell Biol* 1993; 3: 69-72.
21. Parton RG. Ultrastructural localization of gangliosides : GM1 is concentrated in caveolae. *J Histochem Cytochem* 1994; 42: 155-66.
22. Hansen SH, Sandvig K, Van Deurs B. The preendosomal compartment comprises distinct coated and noncoated endocytic vesicle population. *J Cell Biol* 1991; 113: 731-41.
23. Steer CJ, Bisher M, Blumenthal R, Steven AC. Detection of membrane cholesterol by filipin in isolated rat liver coated vesicles is dependent upon removal of the clathrin coat. *J Cell Biol* 1984; 99: 315-9.
24. Racoosin EL, Swanson JA. M-CSF-induced macropinocytosis increases solute endocytosis but not receptor-mediated endocytosis in mouse macrophages. *J Cell Sci* 1992; 102: 867-80.
25. Van Deurs B, Petersen OW, Olsnes S, Sandvig K. The ways of endocytosis. *Int Rev Cytol* 1989; 117: 131-77.
26. Eker P, Holm PK, Van Deurs, Sandvig K. Selective regulation of apical endocytosis in polarized Madin-Darby canine kidney cells by mastoparan and cAMP. *J Biol Chem* 1994; 269: 18607-15.



haut, la déplétion du potassium intracellulaire et l'incubation dans du NaCl 0,35 M [33]. Il convient de souligner que les cellules de notre organisme peuvent être soumises à ces deux perturbations. Les cellules résidentes ou de passage dans les papilles rénales y rencontrent en effet un milieu qui dépasse 900 mosmoles chez l'homme, et davantage chez d'autres espèces. Par ailleurs, la déplétion du potassium intracellulaire a été observée dans des cellules excitables dépolarisées lors de fortes fièvres [34]. Le niveau de déplétion potassique résultant de l'hyperthermie dans des cellules en culture [35] est compatible avec une interruption de l'endocytose rapide liée aux récepteurs [36]. Dans notre travail, ces deux perturbations réduisent de ~90 % la surface et le volume des invaginations et vési-

cules endocytaires recouvertes de clathrine, et ralentissent d'autant la vitesse d'intériorisation des complexes transferrine-récepteur formés à la surface cellulaire. Cette vitesse est ramenée à ~1 % par minute, ce qui correspond à celle de l'endocytose non spécifique de membrane (figure 2A).

En revanche, ces deux perturbations n'affectent pas du tout la vitesse d'entrée de membrane, estimée par l'intériorisation de lipides fluorescents (figure 2B). En outre, la vitesse initiale d'entrée de fluide, estimée par l'endocytose de peroxydase de raifort, est inchangée (figure 3A). Toutefois, les perturbations doublent la vitesse de régurgitation du fluide capté, phénomène qui apparaît après 5 minutes de capture, et se traduit par un ralentissement de la vitesse d'accumulation intracellulaire après

Figure. 2. **Au contraire de l'endocytose rapide de la transferrine, l'internalisation non spécifique de membrane ne dépend pas de la formation de puits mantelés.** A. Flux endocytaire lié aux récepteurs. Cette figure décrit l'internalisation de transferrine (première heure, pulse, traits continus) et son recyclage (deuxième heure, chase, traits discontinus) dans des fibroblastes de rat en culture primaire en conditions témoins (traits et symboles bistres) ou après inhibition de la formation des puits mantelés par déplétion potassique (traits et symboles rouges). Les résultats sont exprimés par le rapport entre le ligand intracellulaire (résistant à la digestion à 4 °C par la pronase) et le ligand lié à la surface (sensible à cette digestion). B. Flux endocytaire de lipides membranaires. Cette figure compare le sort du C6-NBD-glucosyl-céramide, un dérivé lipidique fluorescent qui s'insère dans le feuillet externe de la membrane plasmique, dans des fibroblastes témoins (traits et symboles bistres) ou appauvris en potassium (traits et symboles rouges). La première heure étudie la vitesse d'intériorisation à 37 °C (traits continus), mesurée par la fraction de la sonde fluorescente qui devient résistante à l'extraction en surface par de l'albumine. Après une heure, les cellules sont réincubées dans un milieu dépourvu de la sonde et chargé en albumine, pour étudier le recyclage (traits discontinus). (Adapté de [33].)

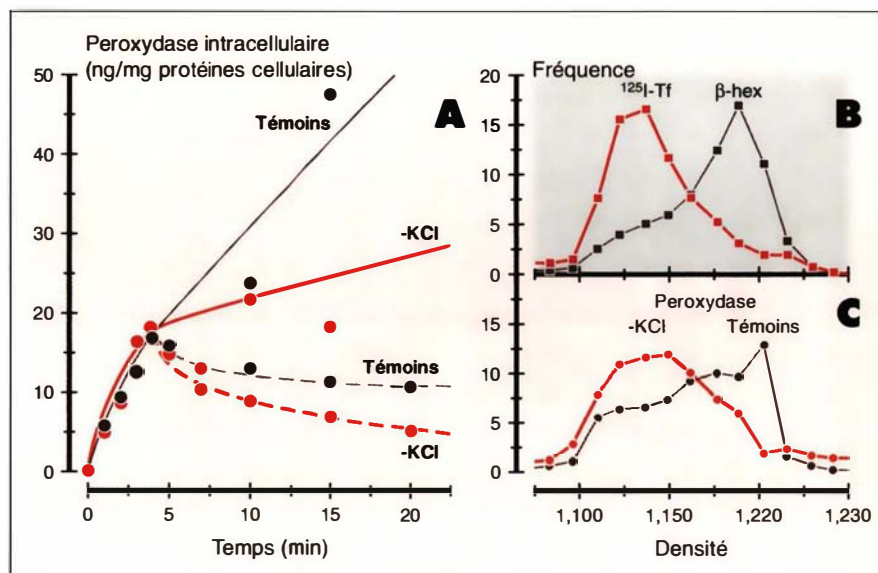


Figure 3. **L'endocytose fluide est indépendante de la formation de puits mantelés, mais la régurgitation est accélérée par la déplétion potassique.** A. Cinétique. L'endocytose est mesurée par l'accumulation intracellulaire de peroxydase de raifort (traits continus). Le ralentissement de cette accumulation après 5 min de capture suggère une régurgitation partielle, plus marquée après déplétion potassique (symboles rouges) que dans les conditions témoins (symboles bistres). Cette interprétation est confirmée par la mesure du relargage de la peroxydase dans le milieu de culture (traits discontinus). La somme de la vitesse d'accumulation et de régurgitation après 5 min rejoint la vitesse d'accumulation initiale. (Adapté de [33].) B. Fractionnement subcellulaire, marqueurs endocytaires. Distribution en gradient de densité des endosomes (chargés en ¹²⁵I-transferrine) et des lysosomes (contenant la N-acétyl-β-hexosaminidase), identique dans les cellules contrôles et appauvries en potassium. C. Fractionnement subcellulaire, traceur de l'endocytose fluide. La distribution de la peroxydase captée pendant une heure recouvre essentiellement celle des lysosomes dans les cellules témoins et celle des endosomes dans les cellules traitées.

cet intervalle. Si l'on additionne les vitesses d'accumulation et de régurgitation, les bilans de l'endocytose fluide sont identiques dans les cellules traitées et les cellules témoins. On peut expliquer l'accélération de la régurgitation par une inhibition du transfert de fluide des endosomes aux lysosomes (figure 3B, C). L'absence d'effet des perturbations sur le flux endocytaire de fluide et de membrane prédit que le diamètre et l'abondance des vésicules endocytaires primaires ne sont pas affectés. La distribution de taille des vésicules endocytaires primaires est effectivement inchangée (figure 4), et permet en outre d'exclure les cavéoles et les structures macropinocytaires comme équivalent structural de la voie indépendante de la clathrine observée dans les fibroblastes traités.

Nature de l'endocytose indépendante de la clathrine

Ces résultats nous amènent à reconsidérer la nature de l'endocytose indépendante de la clathrine, et à poser les questions suivantes sur la machine moléculaire qui la sous-tend.

(1) L'endocytose indépendante de la clathrine, qui définit une propriété mise en évidence dans des cellules soumises à une perturbation sévère, correspond-elle à une structure fondamentalement distincte des puits mantelés, mis à part le recouvrement de clathrine ?

(2) La clathrine participe-t-elle activement au processus d'invagination et de fermeture des puits mantelés, comme il est communément admis (première hypothèse) ou sa fonction

se limite-t-elle à y recruter les protéines transmembranaires capables d'interaction spécifique avec les adaptines (seconde hypothèse) ?

(3) Dans la première hypothèse, quelle serait la machine moléculaire accessoire de l'endocytose, en réserve dans les cellules témoins et démasquée par les perturbations, et comment serait-elle réglée pour compenser les défaillances de la première de manière assez précise ? Faut-il invoquer un recrutement accéléré d'une protéine Rab [37] ? Dans la seconde hypothèse, quelle serait la véritable machine moléculaire de l'endocytose ?

(4) Finalement, les invaginations endocytaires couvertes et non couvertes de clathrine coexistent-elles en l'absence de perturbations, et dans quelles proportions ?

RÉFÉRENCES

27. Larkin JM, Brown MS, Goldstein JL, Anderson RGW. Depletion of intracellular potassium arrests coated pit formation and receptor-mediated endocytosis in fibroblasts. *Cell* 1983; 33: 273-85.
28. Daukas G, Zigmond SH. Inhibition of receptor-mediated but not fluid-phase endocytosis in polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol* 1985; 101: 1673-9.
29. Sandvig K, Olsnes S, Petersen OW, Van Deurs B. Acidification of the cytosol inhibits endocytosis from coated pits. *J Cell Biol* 1987; 105: 679-89.
30. Ryser HJP, Li W, Mandel R, Shen WC. Stable variant of LM fibroblast defective in fluid-phase but competent in receptor-mediated endocytosis. *J Cell Physiol* 1988; 137: 490-6.
31. Wang RH, Colbaugh P, Kao CY, Rutledge EA, Draper RK. Impaired secretion and fluid-phase endocytosis in the End4 mutant of Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1990; 265: 20179-87.
32. Kean LS, Fuller RS, Nichols JW. Retrograde lipid traffic in yeast: identification of two distinct pathways for internalization of fluorescently-labeled phosphatidylcholine from the plasma membrane. *J Cell Biol* 1993; 123: 1403-19.
33. Cupers P, Veithen A, Kiss AL, Baudhuin P, Courtoy PJ. Clathrin polymerisation is not required for bulk-phase endocytosis in rat fetal fibroblasts. *J Cell Biol* 1994; 127: 725-35.
34. Saper CB, Breder CD. The neurologic basis of fever. *N Engl J Med* 1995; 330: 1880-6.
35. Yi PN. Cellular ion content changes during and after hyperthermia. *Biochem Biophys Res Commun* 1979; 91: 177-82.
36. Ilondo MM, Courtoy PJ, Geiger D, Carpentier JL, Rousseau GG, de Meyts P. Intracellular potassium depletion in IM-9 lymphocytes suppresses the slowly dissociating component of human growth hormone binding and the down-regulation of its receptors but does not affect insulin receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 6460-4.
37. Bucci C, Parton RG, Mather IH, Stunnenberg H, Simons K, Hoflack B, Zerial M. The small GTPase Rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* 1992; 70: 715-28.
38. Hansen SH, Sandvig K, Van Deurs B. Molecules internalized by clathrin-independent endocytosis are delivered to endosomes containing transferrin receptors. *J Cell Biol* 1993; 123: 89-97.
39. Oka JA, Christensen MD, Weigel PH. Hyperosmolarity inhibits galactosyl receptor-mediated but not fluid-phase endocytosis in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1989; 264: 12016-24.
40. Schmid SL. Biochemical requirements for the formation of clathrin- and COP-coated transport vesicles. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5: 621-7.
41. Van Der Bliek AM, Meyerowitz EM. Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila shibire* gene associated with vesicular traffic. *Nature* 1991; 351: 411-4.
42. Chen MS, Obar RA, Schroeder C, Austin TW, Poodry CA, Wadsworth SA, Vallee RB. Multiple forms of dynamin are encoded by the *shibire*, a *Drosophila* gene involved in endocytosis. *Nature* 1991; 351: 583-6.
43. Kosaka T, Ikeda K. Reversible blockage of membrane retrieval and endocytosis in the Garland cell of the temperature-sensitive mutant of *Drosophila melanogaster*, *shibire*. *J Cell Biol* 1983; 97: 499-507.
44. Takei K, McPherson PS, Schmid SL, de Camilly P. Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP- γ S in nerve terminals. *Nature* 1995; 374: 186-90.
45. Tsuruhara T, Koenig JH, Ikeda K. Synchronized endocytosis studied in the oocyte of a temperature-sensitive mutant of *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res* 1990; 259: 199-207.
46. Damke H, Baba T, Warnock DE, Schmid SL. Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J Cell Biol* 1994; 127: 915-34.
47. Devaux PF. Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry* 1991; 30: 1163-73.
48. Emans N, Gorvel JP, Walter C, Gerke V, Kellner R, Griffiths G, Gruenberg J. Annexin II is a major component of fusogenic endosomal vesicles. *J Cell Biol* 1993; 120: 1357-69.
49. Beck KA, Keen JH. Interaction of phosphoinositide cycle intermediates with the plasma membrane-associated clathrin assembly protein AP-2. *J Biol Chem* 1991; 266: 4442-7.

Un avantage pour la cellule à posséder plusieurs portes d'entrée indépendantes serait l'endocytose sélective et différentielle de certains constituants, reconnus par des machineries de rétention distinctes. On pourrait alors considérer que l'endocytose dépendante de la clathrine, spécialisée dans le rassemblement et l'intériorisation de ligands physiologiques tels que la transferrine, diverses lipoprotéines, des facteurs de croissance ou des immunoglobulines, joue un rôle essentiel dans la nutrition et la multiplication cellulaires, ainsi que dans l'immunité antimicrobienne. De son côté, l'endocytose indépendante de la clathrine pourrait assurer la rentrée dans la cellule d'autres constituants de la membrane plasmique, tels que des pompes, canaux ou transporteurs, ou divers intermédiaires des systèmes de signalisation transmembranaire, et contribuer ainsi à la régulation de la physiologie cellulaire. De plus, ces modes de rassemblement et d'entrée distincts pourraient conduire à des destinations intracellulaires différentes.

Toutefois, on n'a identifié à ce jour de manière certaine aucun marqueur spécifique d'une endocytose indépendante de la clathrine, qui impliquerait des structures de même taille que celle des puits mantelés. Au contraire, pratiquement tous les constituants membranaires sont détectables dans les puits et vésicules mantelées, si on les y recherche soigneusement [4, 21]. Enfin, des travaux suggérant l'existence de ces deux types d'endocytose montrent également que les constituants intégrés par endocytose par ces différentes structures convergent rapidement vers les mêmes endosomes [38].

En revanche, on admet plus aisément l'existence de deux machines moléculaires distinctes, l'une en réserve de l'autre, au vu des nombreuses observations où l'invalidation (*knock out*) d'un gène n'a pas entraîné de modification du phénotype (première hypothèse). On se doit aussi de considérer la seconde hypothèse, certes plus provocante, selon laquelle la clathrine ne fait pas partie de la véritable machinerie moléculaire de l'endocytose. Celle-ci dépendrait d'une autre machine moléculaire encore inconnue, qui déclencherait l'invagi-

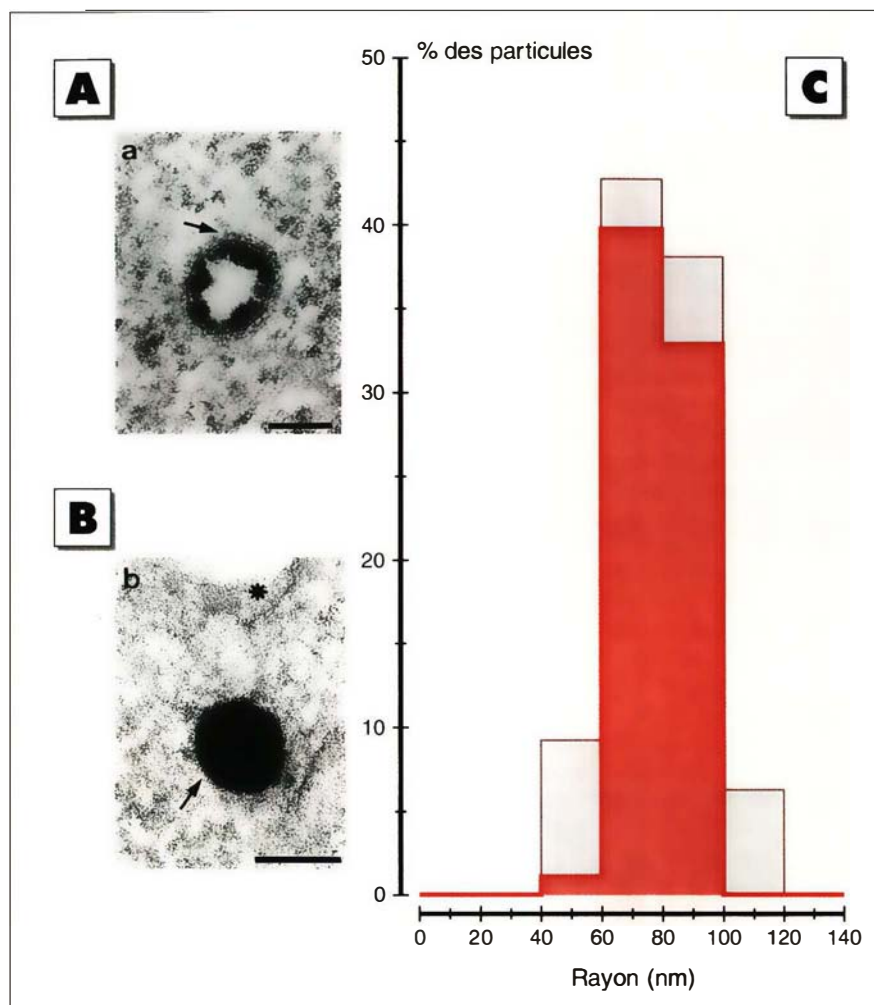


Figure. 4. **Les vésicules endocytaires primaires formées par les puits mantelés et non mantelés ont la même taille.** Des fibroblastes témoins (A; C, trait fin noir) ou appauvris en potassium (B; C, trait rouge) sont incubés pendant ~15 s en présence de peroxydase, qui est ensuite révélée par cytochimie. **A, B.** Aspect ultrastructural. La flèche indique le manteau de clathrine en (A) et son absence en (B). Les barres représentent 100 nm. L'astérisque recouvre la membrane plasmique en coupe tangentielle (clichés réalisés en collaboration avec le Pr A. Kiss). **C.** Distribution de taille des particules. Celle-ci est dérivée de la distribution de taille des profils dans les coupes par la transformation de Wickseil. (Adapté de [33].)

nation et conduirait à la formation des vésicules endocytaires primaires. Dans ce cas, il ne faudrait plus utiliser les termes d'endocytose dépendante ou indépendante de la clathrine, mais bien ceux d'endocytose, d'invaginations et de vésicules associées ou non associées à la clathrine.

Les deux interprétations rendent bien compte de nos observations et de celles de la littérature. Les perturbations empiriques n'affectent pas les flux endocytaires non spécifiques de fluides et de membrane, ni la taille des vésicules endocytaires primaires, mais bloquent l'endocytose rapide de transferrine, réduite à la vitesse de l'endocytose non spécifique de membrane. En effet, des récepteurs dont la séquence d'intériorisation rapide a été tronquée sont toujours détectés dans les puits mantelés, même s'ils sont intégrés par endocytose dix fois

moins vite [4]. Elles expliquent aussi pourquoi l'incubation d'hépatocytes de rat en milieu hypertonique, qui bloque la formation des puits mantelés, ralentit de dix fois l'endocytose liée aux récepteurs sans affecter l'endocytose fluide [39]. Cette observation avait été initialement interprétée en faveur de l'existence de deux voies endocytaires distinctes, l'une dépendante de la clathrine et responsable de l'endocytose liée aux récepteurs, l'autre indépendante de la clathrine, responsable de l'endocytose fluide. Une telle interprétation néglige la contribution nécessaire des puits mantelés à l'endocytose fluide, sauf si la taille ou l'abondance des vésicules endocytaires primaires indépendantes de la clathrine est largement supérieure à celles des puits mantelés. Si la machine moléculaire de l'endocytose n'est pas la clathrine, ou s'il

existe en permanence une machinerie accessoire vicariante, rien n'exclut la coexistence d'invaginations endocytaires recouvertes ou non de clathrine dans les mêmes cellules et il n'y aurait rien de surprenant à voir les deux types de vésicules fusionner avec les mêmes endosomes [19, 38].

Quelle pourrait être cette machine moléculaire? On sait que la formation des puits et vésicules mantelés dépend de nombreux facteurs cytosoliques, dont l'ATP, le GTP, et diverses protéines liant le GTP [40]. Parmi ces dernières, on a identifié la dynamine, l'ARF et des protéines G hétérotrimériques sensibles à l'ion AlF_4^- , mais il est encore trop tôt pour en préciser les rôles respectifs et leur mode d'interaction (*m/s* n° 3, vol. 10, p. 364). Le cas de la dynamine semble particulièrement intéressant. Cette

protéine est affectée de manière thermosensible par la mutation *shibire* chez *Drosophila melanogaster* [41, 42]. La mutation inhibe l'épincage du collet des puits mantelés où la dynamine se concentre [43, 44]. Au niveau des jonctions neuro-musculaires, le blocage de l'endocytose interrompt le recyclage des constituants des vésicules synaptiques et se traduit par la paralysie des drosophiles. L'endocytose fluide est également ralentie dans les cellules du mutant *shibire* [45]. Toutefois, dans des cellules transfectées surexprimant une dynamine inactivée par mutation du site de liaison du GTP, l'endocytose rapide de transferrine est bien inhibée, mais l'endocytose fluide n'est pas affectée [46].

Une autre piste intéressante est celle des lipides membranaires. Les aminophospholipides membranaires présentent une asymétrie transversale, induite par une translocase dépendant de l'ATP. Le transfert d'une faible fraction de la phosphatidylsérine et de la phosphatidyléthanolamine du feuillet interne vers le feuillet externe suffirait à provoquer l'invagination de la membrane plasmique [47]. Cependant, la rapidité de la diffusion latérale des lipides membranaires (correspondant à $\sim 1 \mu\text{m.s}^{-1}$) requiert en outre une stabilisation locale de ces invaginations. Cette fonction pourrait être assurée par des protéines comme les annexines, qui interagissent étroitement avec les phospholipides membranaires et dont certaines peuvent régler l'activité de l'appareil endocytaire [48]. Enfin, des inositolpolyphosphates (IP2, IP4, IP5 et IP6) peuvent se lier à l'extrémité aminoterminal de la sous-unité α des AP2 et inhiber l'assemblage des triskélions sur les puits mantelés [49].

La place dans la machine moléculaire de l'endocytose, laissée vacante ou partagée par la clathrine, peut ainsi être convoitée par de nombreux prétendants. On suivra donc avec intérêt l'analyse de mutants de la levure défectifs pour l'endocytose fluide et l'endocytose par récepteurs [14, 16] ■

Summary

Is clathrin required for bulk endocytosis?

Key features of clathrin-associated endocytosis are outlined, and current evidence in favor of clathrin-independent endocytosis and of its structural counterpart(s) is reviewed. We next summarize our recent observations on clathrin-independent endocytosis in primary cultures of rat foetal fibroblasts, using two reversible inhibitors of the formation of endocytic clathrin-coated pits. Severe inhibition of clathrin polymerization at the plasma membrane slows down receptor-mediated endocytosis of transferrin by ten-fold, without affecting bulk-flow endocytosis of fluid and membrane. Furthermore, the size of primary endocytic vesicles, identified by ultrastructural cytochemistry, is the same in control and treated cells. Two interpretations are offered. The most provocative one proposes that clathrin plays no role in the formation of primary endocytic vesicles, and is only required to concentrate receptors in endocytic pits, accelerating thereby internalization of ligand-receptor complexes. In the second interpretation, inhibition of clathrin polymerization unmasks an accessory molecular machinery, which is not operating under control conditions. In both cases, another endocytic molecular machinery is required and remains to be identified.

Remerciements

Ces recherches ont été conduites avec le soutien financier du FNRS et du programme des Pôles d'Attraction Interuniversitaires. Les auteurs remercient les Professeurs P. Baudhuin et A. Kiss ainsi que V. Morel et M.C. Nassogne pour leurs critiques constructives.

TIRÉS À PART

Ph. Cupers.