

Vésicules recouvertes, polypeptides d'assemblage et phosphorylation

Les vésicules recouvertes de clathrine assurent le transit intracellulaire des constituants membranaires intégrés par endocytose spécifique des récepteurs. Des polypeptides d'assemblage comprenant plusieurs constituants (dont au moins une protéine kinase et un substrat phosphorylable) pourraient interagir avec la partie intracytoplasmique des récepteurs membranaires, subir alors des modifications de phosphorylation permettant leur adhérence à des sites spécifiques de la face interne de la membrane plasmique. Ces polypeptides d'assemblage ainsi positionnés constitueraient des centres de nucléation pour la clathrine et initieraient ainsi la formation des puits et des vésicules recouvertes. Le détail du contrôle de la formation des structures recouvertes et du rôle de la phosphorylation de constituants des polypeptides d'assemblage reste cependant largement inconnu.

Alain Pauloin

Les phénomènes de vésiculation membranaire représentent le mode essentiel d'échange de protéines entre les milieux intra- et extracellulaires ou entre les différents compartiments intracytoplasmiques. L'entrée des protéines dans la cellule peut être un phénomène non sélectif (micropinocytose) ou sélectif, lequel constitue l'endocytose par l'intermédiaire des récepteurs. L'endocytose sélective d'une protéine (ou ligand) va nécessiter une étape de reconnaissance par un récepteur spécifique en préalable à sa pénétration dans la cellule. Les complexes récepteur-ligands sont alors concentrés et internalisés au niveau des puits recouverts (*coated pits*) localisés à la surface de la membrane plasmique, lesquels don-

neront les vésicules recouvertes* (*coated vesicles*) [1]. Les puits et les vésicules recouvertes sont ainsi nommés car ils sont tapissés par un filet protéique à mailles hexagonales appelé clathrine. Ces structures recouvertes de clathrine sont également mises en jeu dans le transport des enzymes lysosomiales du trans-golgi vers les lysosomes [2], dans certaines voies de sécrétion [3] et au cours de la transcytose des IgA et des IgG entre les membranes apicales et basolatérales des cellules polarisées [4, 5] (*figure 1, p. 562*).

La zone des puits recouverts ne représente guère plus de 2 % de la surface cellulaire. Cependant,

* Aussi appelées vésicules épaissies, vésicules hérissées, vésicules mantelées.

ADRESSE

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.

RÉFÉRENCES

1. Goldstein JL, Brown MS, Anderson RGW, Russel DW, Scheider WJ. Receptor-mediated endocytosis : concepts emerging from the LDL. *Ann Rev Cell Biol* 1985 ; 1 : 1-39.
2. Friend DF, Farquhar MG. Functions of coated vesicles during protein absorption in the rat vas deferens. *J Cell Biol* 1967 ; 35 : 357-76.
3. Tooze J, Tooze SA. Clathrin-coated vesicular transport of secretory proteins during the formation of ACTH-containing secretory granules in AtT20 cells. *J Cell Biol* 1986 ; 103 : 839-50.
4. Kuhn LC, Kraehenbuhl JP. Interaction of rabbit secretory component with rabbit IgA dimer. *J Biol Chem* 1979 ; 254 : 11066-71.
5. Abrahamson DR, Rodewald R. Evidence for the sorting of endocytic vesicle contents during the receptor-mediated transport of IgG across the newborn rat intestine. *J Cell Biol* 1981 ; 91 : 270-80.
6. Cosson P, Pepperkok R, Back R, Davoust J. Dynamics of clathrin-coats measured by fluorescence photobleaching in living cells. *J Cell Biol* 1991 (sous presse).
7. Harford J, Wolkoff AW, Ashwell G, Klausner RD. Monensin inhibits intracellular dissociation of asialoglycoproteins from their receptor. *J Cell Biol* 1983 ; 96 : 1824-8.
8. Goldstein JL, Anderson RGW, Brown M. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature* 1979 ; 279 : 679-85.
9. Dautry-Varsat A, Ciechanover A, Lodish HF. pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983 ; 80 : 2258-62.
10. Stoscheck CM, Carpenter G. Down regulation of epidermal growth factor receptors : direct demonstration of receptor degradation in human fibroblasts. *J Cell Biol* 1984 ; 98 : 1048-53.
11. Keen JH, Willingham MC, Pastan IH. Clathrin-coated vesicles : isolation, dissociation and factor-dependent reassociation of clathrin baskets. *Cell* 1979 ; 16 : 303-12.

l'endocytose peut y être si intense que l'équivalent du total de la surface d'une cellule y sera internalisé en une demi-heure. Cela représente la conversion d'environ 3 000 puits recouverts en autant de vésicules recouvertes par minute. Très vite ces dernières vont commencer à perdre leur manteau de clathrine. En effet, le temps de demi-vie de la clathrine assemblée semble n'être que de 15 secondes [6]. Les vésicules maintenant découvertes se dirigent vers le compartiment accepteur appelé endosome précoce (ou primaire) avec lequel elles fusionneront. La nature du complexe récepteur-ligand va déterminer son destin qui s'accomplira selon l'une des quatre possibi-

lités suivantes (figure 1). (1) Le récepteur est recyclé vers la surface cellulaire pour être réutilisé, tandis que le ligand est transporté jusqu'aux lysosomes où il sera hydrolysé. La séparation du ligand de son récepteur est assurée par l'acidification du contenu endosomique grâce à des pompes à protons membranaires [7]. L'endocytose des LDL (*low density lipoprotein*) en constitue l'exemple typique [8]. (2) Le complexe récepteur-ligand est recyclé vers la surface cellulaire. Ainsi, dans le cas de la transferrine, l'acidité du milieu endosomal provoque le relargage du fer par la transferrine, mais l'apotransferrine formée reste liée au récepteur pour être recyclée. Finalement le pH neutre du

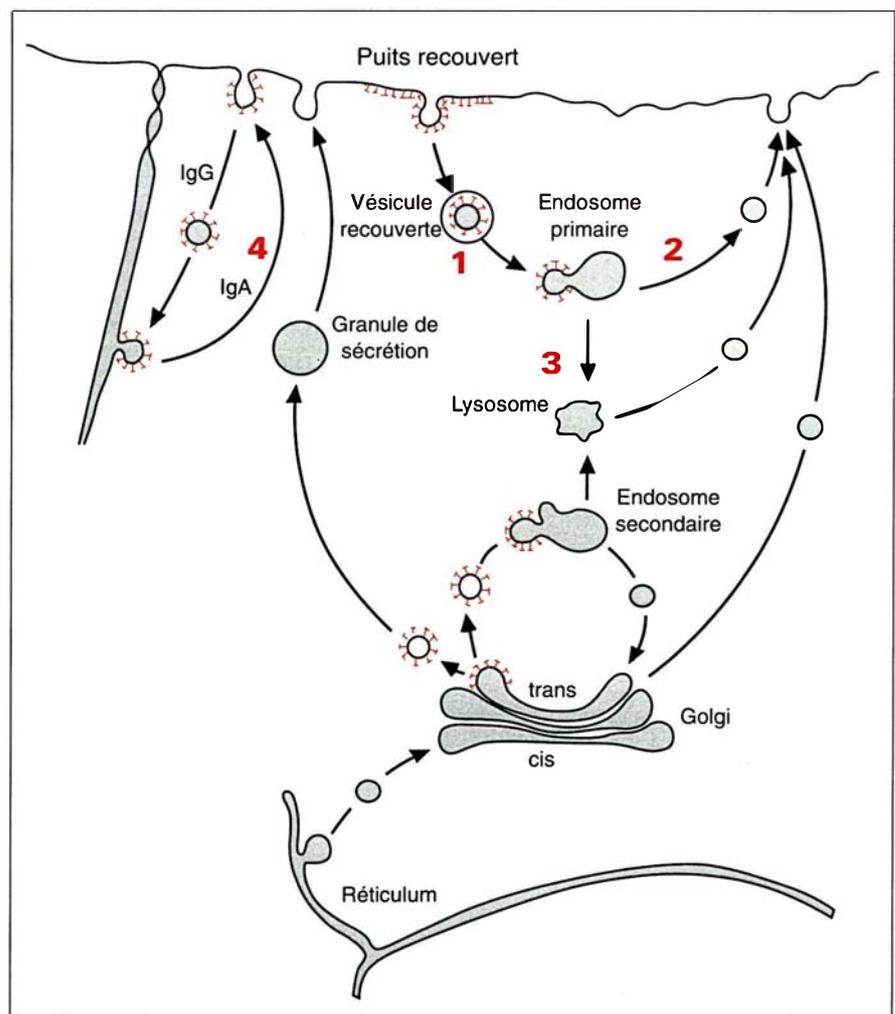


Figure 1. Les différents rôles joués par les vésicules recouvertes dans le transport intracellulaire des protéines. Les numéros renvoient aux différentes voies décrites dans le texte, empruntées par les vésicules recouvertes.

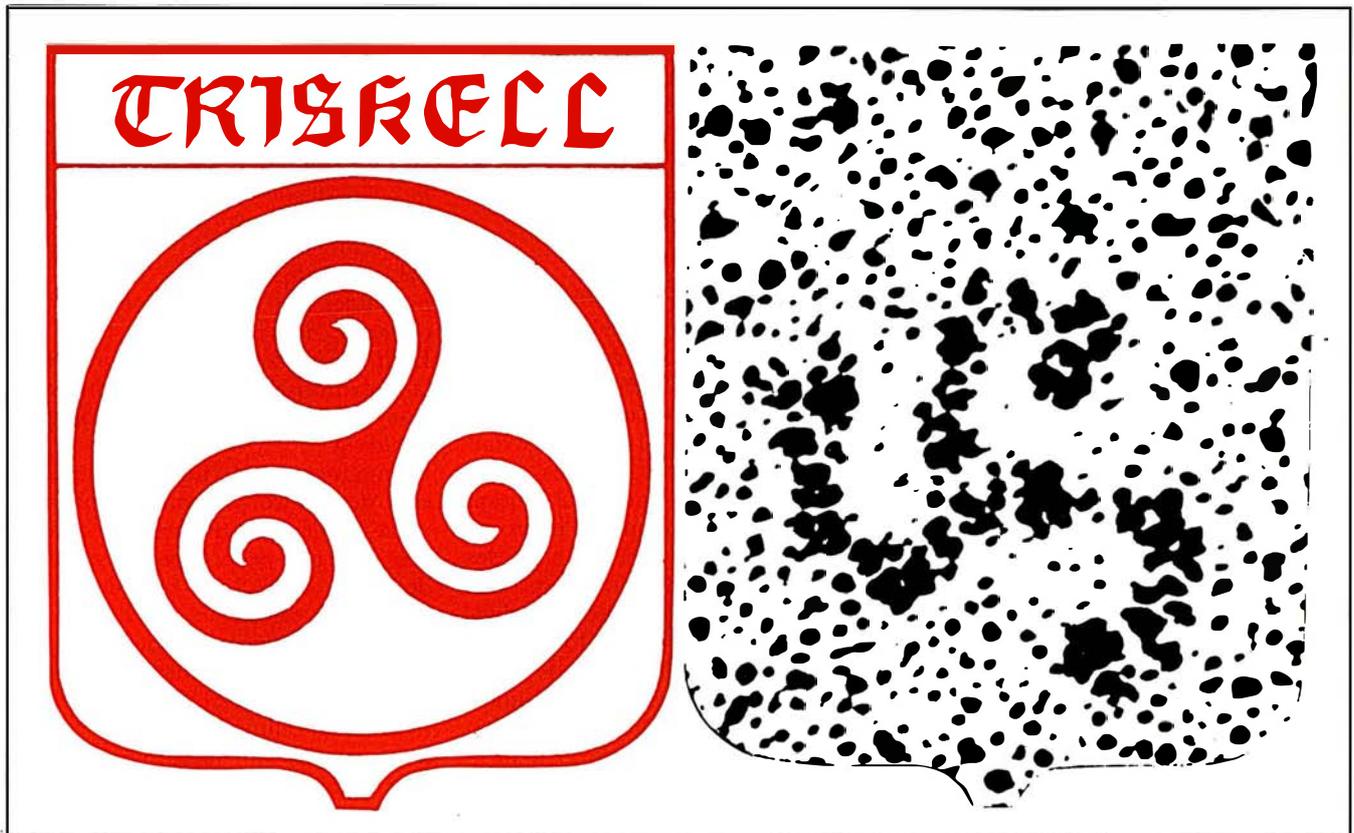


Figure 2. **Le triskèle de clathrine diffère du triskèle celtique par le sens de l'enroulement des bras.** Cet enroulement privilégié dans le sens des aiguilles d'une montre est dû à la configuration du triskèle, qui constitue un volume en forme de pyramide et aux interactions électrostatiques entre la base de cette pyramide et le support d'observation.

milieu extracellulaire permettra la dissociation du complexe [9]. (3) Le complexe récepteur-ligand n'est pas recyclé. Par exemple, l'EGF (*epidermal growth factor*) et son récepteur sont dégradés dans les lysosomes après leur internalisation [10]. (4) Le complexe récepteur-ligand n'est pas recyclé, mais seul le récepteur est dégradé dans les lysosomes. La transcytose des IgA semble en constituer le seul exemple connu [4]. La clathrine est formée par l'assemblage de sous-unités en forme de triskèle (figure 2). Chaque triskèle* est constituée de trois chaînes lourdes de 180 kDa associées à trois chaînes légères de 33 et 36 kDa. D'autres

protéines, réunies sous forme de complexes multimoléculaires de 330 kDa appelées polypeptides d'assemblage en raison de leur capacité à promouvoir la polymérisation de la clathrine soluble *in vitro*, constituent le lien entre la membrane et le manteau de clathrine. Tout un faisceau d'arguments expérimentaux soutient cette hypothèse : (1) les polypeptides d'assemblage assurent la polymérisation *in vitro* de la clathrine soluble pour reformer des cages vides de taille homogène en conditions physiologiques ; (2) la clathrine peut-être retirée des vésicules recouvertes *in vitro* selon des conditions qui conservent les polypeptides d'assemblage associés à la vésicule ; (3) la clathrine est susceptible de se repolymériser à la surface de la vésicule à moins que les polypeptides d'assemblage n'aient été éliminés ou dégradés ; (4) le site de fixation membranaire des polypeptides d'assemblage correspond à une

protéine intégrale partiellement extractible par le Triton $\times 100$ (5) la reconstitution tridimensionnelle par ordinateur de la structure des vésicules recouvertes à partir de clichés obtenus en microscopie électronique montre clairement que les polypeptides d'assemblage sont situés entre le réseau de clathrine et la vésicule (figure 3).

En raison de l'extrême efficacité et de l'extrême spécificité avec lesquelles les complexes récepteur-ligands sont concentrés au niveau des puits recouverts, la clathrine et, plus probablement, les polypeptides d'assemblage doivent participer intimement à ce phénomène de reconnaissance-capture. Si l'endocytose sélective commence à être bien connue d'un point de vue descriptif, son fonctionnement au niveau moléculaire reste encore mal compris. La question des mécanismes permettant la reconnaissance des complexes récepteur-ligands

* Triskèle : n.m. (gr. triskelès, à trois jambes).
1. Type monétaire antique fait de trois jambes courant qui rayonnent autour d'un centre. 2. Motif décoratif celtique dérivé par extrême schématisation du type monétaire antique (ce motif évoquerait le mouvement perpétuel).

RÉFÉRENCES

12. Pearse BMF, Robinson MS. Purification and properties of 100 kd proteins from coated vesicles and their reconstitution with clathrin. *EMBO J* 1984 ; 3 : 1951-7.
13. Robinson MS. 100 kd coated vesicle proteins : molecular heterogeneity and intracellular distribution studied with monoclonal antibodies. *J Cell Biol* 1987 ; 104 : 887-95.
14. Chappell TG, Welch WJ, Schlossman DM, Palter KB, Schlesinger MJ, Rothman JE. Uncoating ATPase is a member of the 70 kilodalton family of stress proteins. *Cell* 1986 ; 45 : 3-13.
15. Bretscher MS, Thomson JN, Pearse BMF. Coated pits act as molecular filters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980 ; 77 : 4156-3.
16. Anderson RGW, Goldstein JL, Brown MS. A mutation that impairs the ability of lipoprotein receptors to localize in coated pits on the cell surface of human fibroblasts. *Nature* 1977 ; 270 : 695-9.
17. Lazarovits J, Roth MA. A single amino acid change in the cytoplasmic domain allows the Influenza virus hemagglutinin to be endocytosed through coated pits. *Cell* 1988 ; 53 : 743-52.
18. Pearse BMF. Receptors compete for adaptors found in plasma membrane coated pits. *EMBO J* 1988 ; 7 : 3331-6.
19. Glickman JN, Conibear E, Pearse BMF. Specificity of binding of clathrin adaptors to signals on the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *EMBO J* 1989 ; 8 : 1041-7.
20. Kirchhausen T, Nathanson KL, Matsui W, et al. Structural and functional division into two domains of the large (100 to 115 kDa) chains of the clathrin-associated protein complex AP-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 2612-6.
21. Pauloin A, Bernier I, Jolles P. Presence of cyclic nucleotide Ca^{2+} independent protein kinase in bovine brain coated vesicle. *Nature* 1982 ; 298 : 574-6.

susceptibles d'être internalisés reste posée. Des éléments de réponse commencent à apparaître principalement grâce à l'analyse détaillée des protéines constituant les polypeptides d'assemblage.

Les polypeptides d'assemblage

Les polypeptides d'assemblage (également appelés adaptateurs) sont obtenus après filtration sur gel d'une préparation de vésicules recouvertes préalablement dissociée par le Tris à haute force ionique [11]. Ils peuvent être séparés en deux groupes appelés HA1 et HA2, d'après leur élution séquentielle d'une colonne d'hydroxylapatite [12]. HA1 et HA2 sont des hétérotétramères de structure très voisine. HA1 est constitué des adaptines β' (105 kDa) et γ (115 kDa) et des protéines de 20 kDa et 47 kDa, tandis que HA2 comprend les adaptines α (105-112 kDa) et β (104 kDa) associées aux protéines de 17 kDa et 50 kDa. Ces différentes adaptines présentent de fortes homologies deux à deux, c'est-à-dire α avec γ et β avec β' . L'adaptine α existe sous

deux formes dénotées α_a et α_c produites par deux gènes différents. Quoique α_c soit produite par la plupart des cellules, α_a est surtout exprimée dans les cellules nerveuses. La détermination du rôle exact joué par chaque adaptine vient juste de commencer, mais les premiers résultats semblent indiquer que β' et probablement β sont respectivement responsables de l'interaction avec la clathrine de HA1 et celle de HA2. Enfin, HA1 comme HA2 permettent la polymérisation de la clathrine *in vitro* en conditions physiologiques (figure 4).

La microscopie de fluorescence utilisant des anticorps mono- et polyclonaux dirigés contre certaines adaptines a permis de préciser la situation de HA1 et HA2 au sein de la cellule. HA1 est localisé exclusivement au niveau du golgi tandis que HA2 est présent au niveau de la membrane plasmique [13]. Toutes les structures cellulaires reconnues par les anticorps anti-HA1 ou anti-HA2 sont également reconnues par les anticorps anti-clathrine. Cela suggère que la perte de la clathrine par la vésicule s'accompagne également de

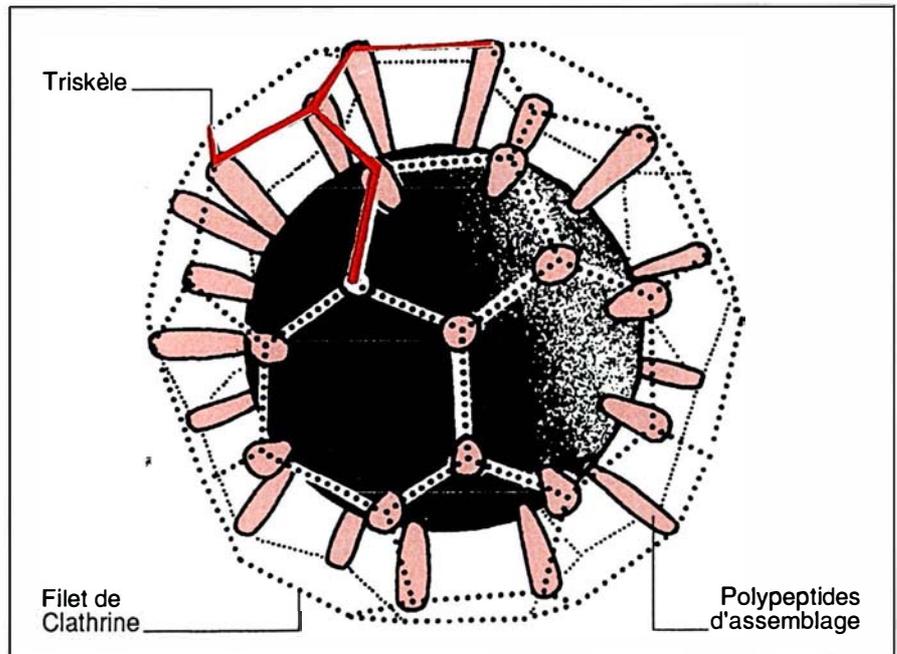


Figure 3. **Structure des vésicules recouvertes.** Les lignes pointillées représentent le réseau de clathrine, caractérisé par les facettes hexagonales et pentagonales assemblées à la surface de la vésicule. Un triskèle constitutif de ce réseau est représenté en trait plein.

la perte des polypeptides d'assemblage, et que le recyclage de ces derniers, comme de la clathrine, doit s'effectuer en même temps pour reformer des structures recouvertes nouvelles. Si l'enzyme responsable de l'enlèvement de la clathrine est connue et correspond à une protéine cytosolique de 70 kDa du choc thermique [14], celle qui serait responsable du relargage des polypeptides d'assemblage reste à découvrir (figure 5).

Rôle des polypeptides d'assemblage dans l'endocytose sélective

Il est maintenant bien connu que les puits recouverts sont capables de distinguer, parmi toutes les protéines réceptrices transmembranaires, celles devant être internalisées de celles devant rester à la surface cellulaire [15]. Le mécanisme le plus simple responsable de ce choix serait que le récepteur lui-même porte l'information nécessaire à son internalisation. Les premiers éléments en faveur de cette hypothèse ont été apportés par l'étude au niveau moléculaire de certaines hypercholestérolémies familiales. Ces études ont mis en évidence l'importance fondamentale de la partie cytoplasmique du récepteur des LDL (c-LDLr). La mutation ponctuelle JD, qui substitue une cystéine à la tyrosine située 18 acides aminés à partir de la membrane (Tyr 807), conduit à inhiber presque totalement l'internalisation du récepteur [16]. L'étude de certaines mutations portées par le récepteur à la transferrine humaine a montré également qu'une mutation ponctuelle qui substitue une glycine à une tyrosine portée par la partie cytoplasmique, conduit à inhiber l'internalisation. Les mêmes résultats furent également observés pour les récepteurs des immunoglobulines polymérisées et du mannose-6-phosphate. Inversement, l'hémagglutinine du virus *Influenza*, qui n'est pas normalement internalisable *via* les puits recouverts, pourra l'être après remplacement de la cystéine en position 6 par une tyrosine sur le court domaine cytoplasmique (dix résidus) de la protéine [17]. Les remarquables travaux de l'équipe de Pearse ont récemment démontré

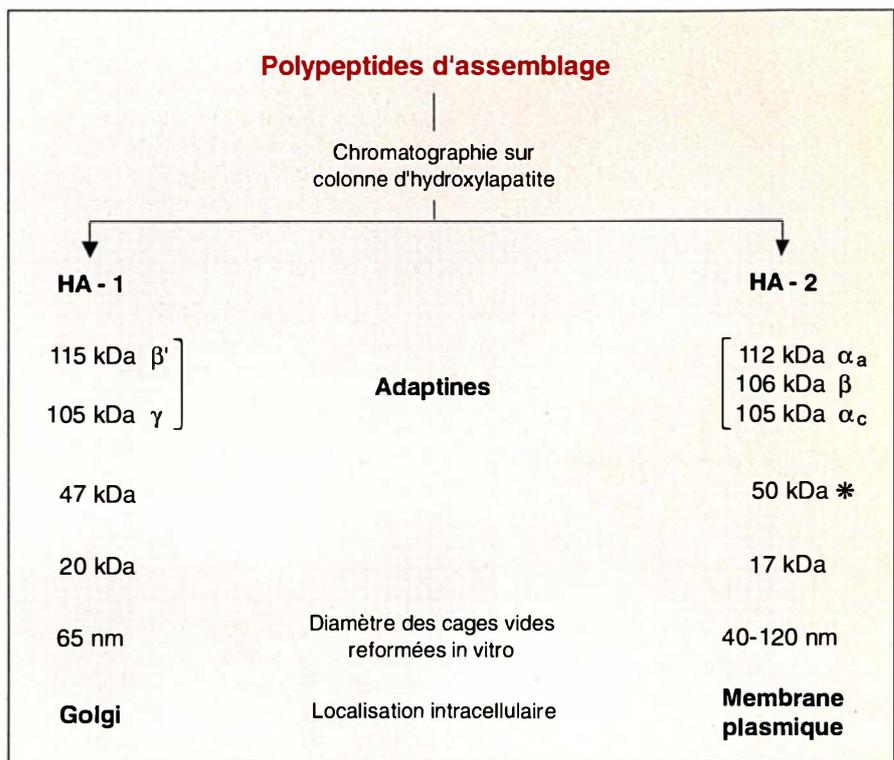


Figure 4. **Comparaison des caractéristiques biochimiques et biologiques des polypeptides d'assemblage HA1 et HA2.** * : phosphorylable.

le rôle fondamental de HA1 et de HA2 dans ce phénomène [18]. Une colonne d'affinité greffée avec le c-LDLr retient spécifiquement HA2 quand HA1 est élué directement. L'interaction HA2/c-LDLr peut être inhibée par les autres récepteurs internalisables par les puits recouverts tel le récepteur du mannose-6-phosphate (M6Pr) ou par le domaine cytoplasmique de l'hémagglutinine du virus *Influenza* ayant subi la mutation Cys \rightarrow Tyr. Le même type d'expérience utilisant le domaine cytoplasmique du M6Pr greffé sur une colonne d'affinité montre que HA1 et HA2 sont retenus sur la colonne. A la différence du LDLr, qui est localisé exclusivement au niveau de la membrane plasmique et du trans-golgi, le M6Pr est concentré dans les puits recouverts situés au niveau de la membrane plasmique et du trans-golgi. L'absence de compétition mutuelle entre HA1 et HA2 suggère que chacun reconnaît un site spécifique sur le c-M6Pr [19]. La mutation des deux tyrosines portées par le c-M6Pr supprime toute interaction de celui-ci avec HA2, mais ne modifie pas

son interaction avec HA1. Ces résultats semblent indiquer que les différents récepteurs susceptibles d'être internalisés possèdent, sur leur domaine cytoplasmique, une région particulière de reconnaissance comportant une tyrosine indispensable à l'interaction avec HA2. En revanche, HA1 reconnaît un signal différent. Les adaptines relatives à HA2 ont une structure commune organisée selon deux domaines. L'un, relativement invariant et situé du côté N-terminal, est en liaison avec les protéines de 17 et 50 kDa. Ce domaine serait responsable de l'interaction de HA2 avec les autres constituants des vésicules ou des puits recouverts. L'autre, situé du côté C-terminal, est suffisamment variable en séquence et en taille pour constituer le domaine de reconnaissance de la « tyrosine-signal » [20].

Phosphorylation-déphosphorylation des vésicules recouvertes

La protéine de 50 kDa (appelée pp50 ou AP50) associée à HA2 a été le

RÉFÉRENCES

22. Pauloin A, Thurieau C. The assembly polypeptide-subunit AP50 from clathrin-coated vesicles is phosphorylated on threonine-156 by the AP50-kinase associated with the HA-1 assembly polypeptide complex (soumis pour publication).
23. Thurieau C, Brosius J, Burne C, *et al.* Molecular cloning and complete amino acid sequence of AP50, an assembly protein associated with clathrin-coated vesicles. *DNA* 1988 ; 7 : 663-9.
24. Pauloin A, Jolles P. Presence of a MgATP/ADP-dependent pp50 phosphatase in bovine brain coated vesicles. *J Biol Chem* 1986 ; 261 : 12568-73.
25. Pauloin A, Jolles P. Internal control of the coated vesicle pp50-specific kinase complex. *Nature* 1984 ; 311 : 265-7.
26. Hanson VG, Schook WJ, Puszkis S. Novel regulatory role of phosphorylated clathrin light chain β in bovine brain coated vesicles. *J Neurochem* 1990 ; 54 : 46-50.
27. Pauloin A, Thurieau C, Jolles P. Cyclic phosphorylation/dephosphorylation cascade in bovine brain coated vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1988 ; 968 : 91-5.
28. Cantournet B, Creuzet C, Komano O, Loeb J. Clathrin β -light chain of rat liver coated vesicles is phosphorylated *in vitro* and *in vivo*. *FEBS Lett* 1987 ; 220 : 143-8.
29. Bar-Zvi D, Mosley ST, Branton D. *In vivo* phosphorylation of clathrin-coated vesicle proteins from rat reticulocytes. *J Biol Chem* 1988 ; 263 : 4408-15.
30. Keen JH, Black MM. The phosphorylation of coated membrane proteins in intact neurons. *J Cell Biol* 1986 ; 102 : 1325-33.
31. Bar-Zvi D, Branton D. Clathrin-coated vesicles contain two proteins kinases activities. *J Biol Chem* 1986 ; 261 : 9614-21.
32. Meresse S, Ludwig T, Frank R, Hoflack B. Phosphorylation of the cytoplasmic domain of the bovine cation-independent mannose-6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 18833-42.
33. Martin-Perez J, Bar-Zvi D, Branton D, Erikson RL. Transformation by Rous sarcoma virus induces clathrin heavy chain phosphorylation. *J Cell Biol* 1989 ; 109 : 577-84.
- premier constituant des vésicules recouvertes dont la phosphorylation *in vitro* a été mise en évidence [21]. Une protéine kinase indépendante du Ca^{2+} et de l'AMPc/GMPc et associée aux polypeptides d'assemblage assure sa phosphorylation *in vitro* sur la thréonine-156 [22]. Si la comparaison de la séquence de l'AP50 avec les autres séquences protéiques actuellement disponibles dans les banques de données n'a pas révélé de similitude significative [23], la recherche de séquences consensus au sein de l'AP50 a donné des résultats inattendus. Ainsi le motif consensus correspondant au site de fixation de l'ATP est absent. Cela est en contradiction avec l'hypothèse selon laquelle AP50 assurerait son autophosphorylation, car ce motif consensus est présent dans la quasi-totalité des protéine kinases. En revanche, il est curieux de constater la présence de la plus grande partie des séquences consensus correspondant au site catalytique des protéine kinases. La présence du site de fixation de l'ATP sur l' α -adaptine laisserait à penser que la complémentarité de ce site avec le site catalytique fourni par l'AP50 au sein de HA2, pourrait conduire à la phosphorylation de AP50. Cependant l'incubation de HA2 purifié en présence d'ATP[γ ³²P] ne permet pas la phosphorylation de AP50. Celle-ci ne sera observée que si HA1 est ajouté au mélange réactionnel. Cette expérience a démontré que AP50 n'est pas autophosphorylable et que cette protéine est un substrat pour l'AP50 kinase associée à HA1 [22]. Une activité AP50-phosphatase présente sous la forme d'une enzyme interconvertible associée à la vésicule a aussi été mise en évidence [24]. La clathrine elle-même est capable de moduler la phosphorylation de AP50. Les chaînes légères, et plus précisément la phosphorylation de la chaîne β , en seraient responsables [25, 26]. Enfin, le niveau de phosphorylation de AP50 est gouverné par le rapport de concentration cytoplasmique ATP/ADP [27].
- La phosphorylation *in vivo* des vésicules recouvertes a été étudiée par plusieurs équipes. Les résultats concernant la phosphorylation de AP50 varient en fonction du tissu considéré [28, 29], les différences observées pouvant être dues à la présence d'AP50 phosphatases qui peuvent être très actives notamment dans le tissu nerveux [30]. En plus de la phosphorylation de AP50, toutes les études *in vivo* ont rapporté la constante phosphorylation des adaptines et de la chaîne légère β de la clathrine. La phosphorylation de cette dernière est due à la présence d'une caséine kinase de type 2 associée aux vésicules recouvertes [31]. *In vitro*, la réaction enzymatique est strictement dépendante de la présence de poly-L-lysine. Les adaptines aussi bien que la chaîne légère β de la clathrine sont phosphorylées *in vivo* et *in vitro* sur des résidus sérine.
- Il a été montré très récemment que la protéine de 47 kDa constitutive de HA1 est une caséine kinase de type 2 qui assure la phosphorylation *in vitro* de la partie cytoplasmique du récepteur du mannose-6-phosphate sur les sérines qui sont aussi phosphorylées *in vivo*. *In vitro*, cette enzyme est également capable de phosphoryler la chaîne légère β de la clathrine [32]. Enfin, la chaîne lourde de la clathrine isolée de fibroblastes d'embryon de poulet préalablement infectés par le virus du sarcome de Rous, est phosphorylée *in vivo* sur des résidus sérine et tyrosine. *In vitro*, la chaîne lourde de la clathrine est phosphorylable sur les mêmes sites par pp60^{v-src}. Dans les cellules normales, la chaîne lourde de la clathrine n'est pas phosphorylée [33].

Fonctions physiologiques possibles induites par la phosphorylation des vésicules recouvertes

La phosphorylation-déphosphorylation d'une protéine, assurée respectivement par une protéine kinase et une phosphoprotéine phosphatase, constitue un système cascade monocyclique universellement employé dans la régulation de la quasi-totalité des phénomènes biochimiques. Si la nature des mécanismes régulateurs de l'endocytose sélective reste encore inconnue, la présence d'activités protéine kinases et phosphatases au sein des vésicules recouvertes suggère que des phénomènes de phosphorylation-déphosphorylation pourraient jouer un rôle majeur.

Quel signal déclenche l'apparition des puits recouverts qui conduiront à la formation des vésicules recouvertes ? Quelles sont les forces responsables des mouvements de membrane ? Quelles sont les protéines qui contrôlent tout le processus ? Pourquoi certains récepteurs sont-ils recyclés et d'autres non ? Toutes ces questions sont encore sans réponse. Si des phénomènes de phosphorylation peuvent être impliqués dans toutes ces étapes, très peu de résultats expérimentaux sont actuellement disponibles. Néanmoins, l'étude de la phosphorylation *in vivo* des vésicules recouvertes des réticulocytes de rat a montré que non seulement AP50 est phosphorylée, mais également la chaîne légère β de la clathrine et les adaptines. La comparaison des taux de phosphorylation des polypeptides d'assemblage, soit sous forme particulaire (associés à la clathrine) au sein des structures recouvertes, soit sous forme soluble dans le cytosol, a montré que la phosphorylation de l'AP50 et de la chaîne légère β de la clathrine est plus forte dans la fraction soluble, tandis que les protéines de 100-110 kDa sont davantage phosphorylées sous la forme particulaire [29]. La polymérisation de la clathrine en présence des polypeptides d'assemblage étant indépendante de l'état de phosphorylation de ces derniers ou de la présence d'ATP, la probable régulation par les réactions de phosphorylation-déphosphorylation pourrait jouer en amont, c'est-à-dire au moment de l'interaction des polypeptides d'assemblage avec les sites de fixation membranaire. Cette hypothèse a été confortée depuis la mise au point d'un système acellulaire qui a permis de montrer que l'assemblage des puits recouverts est initié par la fixation de HA2 sur des sites protéiques portés par des membranes fixées sur un substratum. Cependant HA2 doit être activé (phosphorylé ?) afin de pouvoir fixer la clathrine [34]. L'hypothèse selon laquelle l'état de phosphorylation des polypeptides d'assemblage permettrait ou non leur ancrage sur des protéines membranaires spécifiques et constituerait un site de nucléation où la clathrine pourrait se fixer et ainsi initier la formation des structures recouvertes est illustré par le modèle théorique de

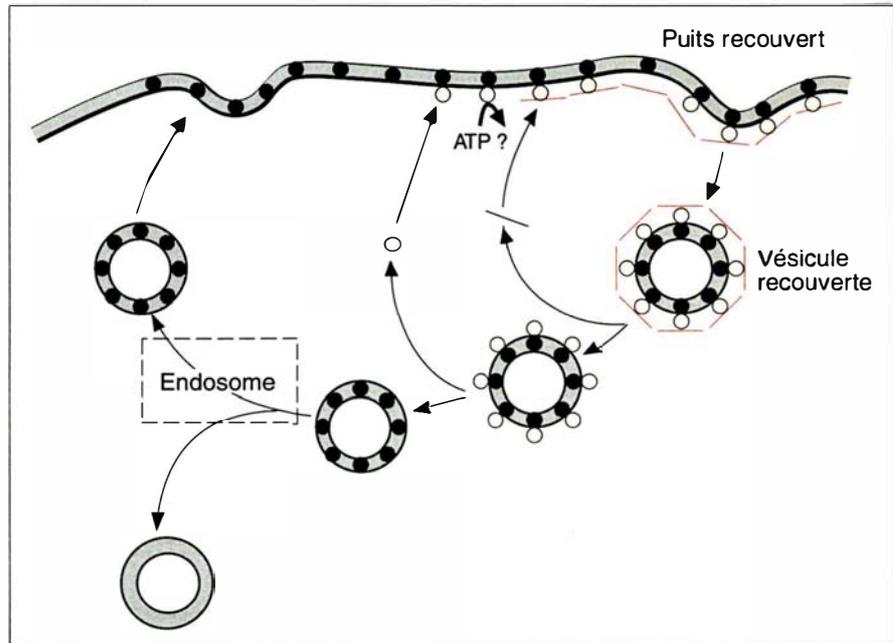


Figure 5. **Modèle proposé pour illustrer le recyclage de la clathrine et des polypeptides d'assemblage au cours des cycles de formation/destruction des puits et des vésicules recouvertes.** ● récepteur membranaire des polypeptides d'assemblage ; ○ polypeptides d'assemblage ; --- triskèle de clathrine.

recyclage de la clathrine et des polypeptides d'assemblage (figure 5). Relativement peu de choses sont connues à propos des mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de la formation des puits recouverts. Cependant l'augmentation de la formation des puits recouverts, associée à l'hyperexpression du récepteur de la transferrine, suggère que la partie cytoplasmique du récepteur est responsable du phénomène [35]. Il en est de même pour l'insuline qui induit la polymérisation de la clathrine au niveau de la membrane plasmique des adipocytes aux dépens de la clathrine soluble cytoplasmique. Ces résultats montrent que la formation des structures recouvertes peut être sous le contrôle partiel d'une stimulation hormonale [36]. L'incubation d'adipocytes en présence de phosphate radioactif permet la phosphorylation de AP50, de la chaîne légère β de la clathrine et des adaptines. En présence d'insuline, une protéine supplémentaire de 125 kDa est phosphorylée. Cette protéine, soit serait associée aux polypeptides d'assemblage, soit constituerait un polypeptide d'assemblage spécifique des adipocytes, comme la pro-

téine de 110 kDa (appelée auxiline) dans le cas du cerveau [37]. Il a été suggéré que la phosphorylation de la clathrine serait un mécanisme régulateur de l'assemblage de la clathrine et/ou de l'endocytose des récepteurs. Cependant, l'insuline ne semble pas moduler la phosphorylation de la chaîne légère β . De même, la phosphorylation de la chaîne lourde dans les fibroblastes transformés par le RSV n'a lieu ni dans les cellules normales ni en réponse à l'insuline, aux esters de phorbol ou aux nucléotides cycliques. Ainsi, la capacité de l'insuline à modifier l'endocytose de l'adipocyte n'apparaît pas liée à la phosphorylation de la clathrine, mais plutôt à celle des polypeptides d'assemblage.

Conclusion

Le considérable essor de la biologie cellulaire au cours de ces dix dernières années a mis en lumière l'intense circulation membranaire intracytoplasmique responsable du transport des protéines au sein de la cellule et l'extrême complexité des phénomènes régulateurs associés. Cela est particu-

RÉFÉRENCES

34. Mahaffey DT, Peeler JS, Brodsky FM, Anderson RGW. Clathrin-coated pits contain an integral membrane protein that binds the AP-2 subunit with high affinity. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 16514-20.
35. Iacopetta BJ, Rothemberger S, Kuhn LC. A role for the cytoplasmic domain in transferrin receptor sorting and coated pit formation during endocytosis. *Cell* 1988 ; 54 : 485-9.
36. Corvera S. Insulin stimulates the assembly of cytosolic clathrin onto adipocyte plasma membranes. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 2413-6.
37. Ahle S, Ungewickell E. Auxilin, a newly identified clathrin-associated protein in coated vesicles from bovine brain. *J Cell Biol* 1990 ; 111 : 19-29.
38. Dunphy WG, Rothman JE. Compartmental organization of the Golgi stack. *Cell* 1985 ; 42 : 13-21.
39. Block MR, Glick BS, Wilcox CA, Wieland FT, Rothman JE. Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 ; 85 : 7852-6.
40. Beckers CJM, Block MR, Glick BS, Rothman JE, Balch WE. Vesicular transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi stack requires the NEM-sensitive fusion protein. *Nature* 1989 ; 339 : 397-8.
41. Diaz R, Mayorga LS, Weidman PJ, Rothman JE, Stahl PD. Vesicle fusion following receptor-mediated endocytosis requires a protein active in Golgi transport. *Nature* 1989 ; 339 : 398-400.
42. Serafini T, Stenbeck G, Brecht A, et al. A coat subunit of Golgi-derived non-clathrin-coated vesicles with homology to the clathrin-coated vesicle coat protein β -adaptin. *Nature* 1991 ; 349 : 215-20.
43. Duden R, Griffiths G, Frank R, Argos P, Kreis TE. β -COP, a 110 kd protein associated with non-clathrin-coated vesicles and the Golgi complex, shows homology to β -adaptin. *Cell* 1991 ; 64 : 649-65.
44. Orci L, Tagaya M, Amherdt M, et al. Brefeldin A, a drug that blocks secretion, prevents the assembly of non-clathrin-coated buds on Golgi cisternae. *Cell* 1991 ; 64 : 1183-95.

lièrement bien illustré par les travaux du groupe de J. Rothman relatif aux transports entre les différents compartiments du golgi [38]. Malgré tout, une relative unification apparaît au fur et à mesure de la progression des études sur la nature moléculaire des composés mis en jeu. Par exemple, le NSF (*N-ethylmaleimide sensitive factor*), connu d'abord comme une protéine cytosolique impliquée dans les transports intragolgiens [39], est apparu également impliqué dans les transports entre le réticulum rugueux et le *cis*-golgi et dans la fusion *in vitro* des endosomes [40, 41]. Dans le même ordre d'idées, il est apparu tout récemment que la sous-unité de 110 kDa appelée β -COP (pour *coat protein*), constitutive du matériau qui enveloppe les vésicules impliquées dans les transports intragolgiens, est fortement homologue à la β -adaptine [42]. Plus étonnant encore, la β -COP constitue la cible d'action de la bréfeldine A, drogue dont l'action provoque la dissociation réversible du golgi [43, 44]. Peut-être d'autres homologies entre les trois autres COP (α , γ , δ) et les autres protéines constitutives des polypeptides d'assemblage apparaîtront-elles quand toutes les séquences protéiques seront connues, ce qui apportera un éclairage nouveau sur les fonctions de toutes ces protéines.

Le rôle joué par les polypeptides d'assemblage dans le fonctionnement des structures recouvertes est fondamental. Ils constituent l'interface clathrine-membrane, ils permettent d'initier la formation des structures recouvertes, ils permettent la reconnaissance des récepteurs devant être internalisés et ils sont peut-être aussi impliqués dans les interactions avec le système cytosquelettique. S'il ne fait guère de doute que la phosphorylation des polypeptides d'assemblage intervient dans la régulation de tout ou partie de ces événements, il reste à découvrir précisément lesquels ■

Remerciements

L'auteur tient à remercier Mme M. Ollivier-Bousquet pour les critiques apportées lors de la rédaction de ce manuscrit. Cette recherche a bénéficié du soutien du Cnrs et de l'Association pour la recherche sur le cancer (contrat n° 6866).

Summary

Clathrin-coated vesicles, assembly polypeptides and phosphorylation

Clathrin coated vesicles mediate the transport of membrane proteins among various membrane compartments within the cell and are involved in the internalization of selected plasma membrane components during receptor-mediated endocytosis. The simplest model would be that the transmembrane receptor proteins that collect in coated pits and vesicles all share a common feature on their cytoplasmic domain that interact with one of the coat proteins. Assembly polypeptides which contain adaptins, protein kinases and the 50 kDa-specific protein kinase substrate are the most likely candidates for that interaction.

One of the key issues here is how the cell assembles clathrin and assembly polypeptides onto the membrane to construct coated pits and vesicles and how phosphorylation-dephosphorylation processes can be implicated in this phenomenon.

TIRÉS A PART

A. Pauloin.