

Transport vésiculaire : endocytose et exocytose

I. L'endocytose : flux entrant de matière par vésiculation

1- Mise en évidence de l'endocytose

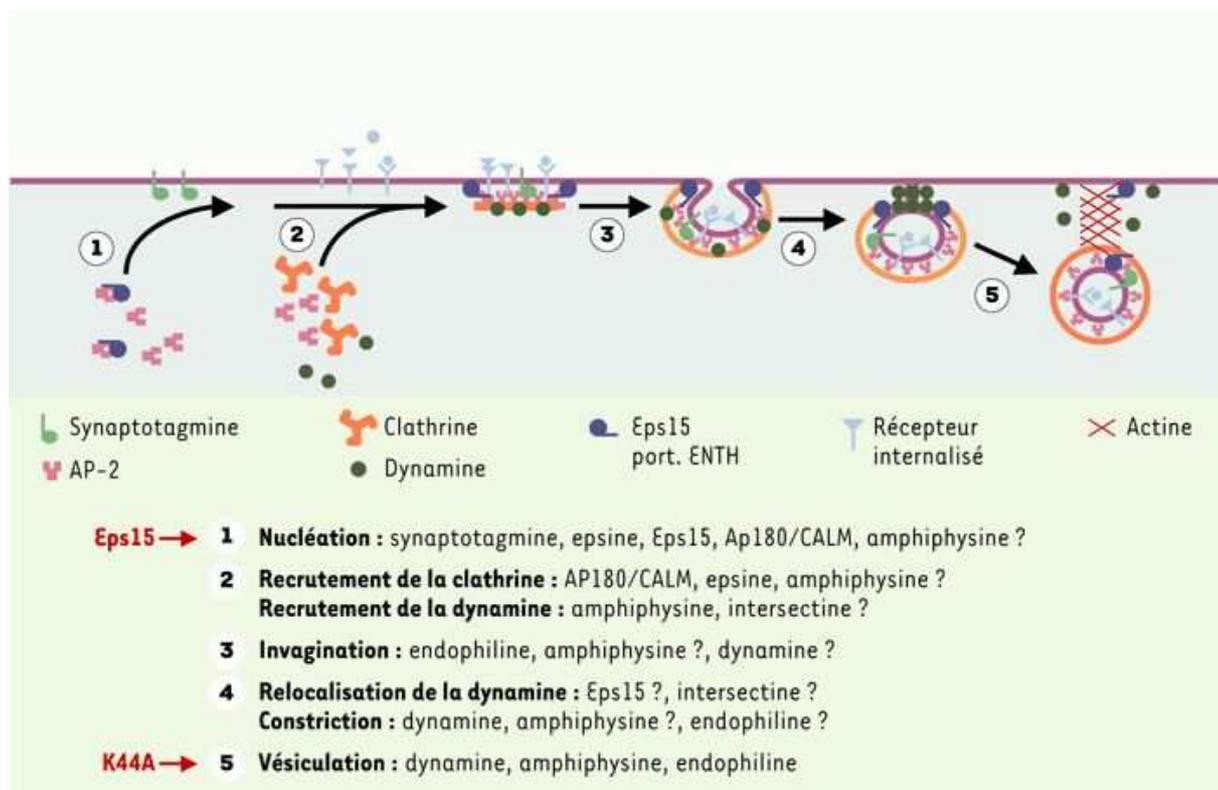
- Observations statique au microscope électronique
Cf. doc 1A (ici, à transmission)
Cf. doc 1B (ici, microscopie à balayage)
- Observation dynamique : immunocytofluorescence et microvidéoscopie sur microscope confocal

2- Mécanismes moléculaires de l'endocytose à puit recouvert de clathrine

a) Endocytose à puits de clathrine

Triskélions de clathrine polymérisent en feuillage périphérique (recouvrement ou "coat") autours de la vésicule (en nid d'abeille) via AP2.

Cf. Doc n°2



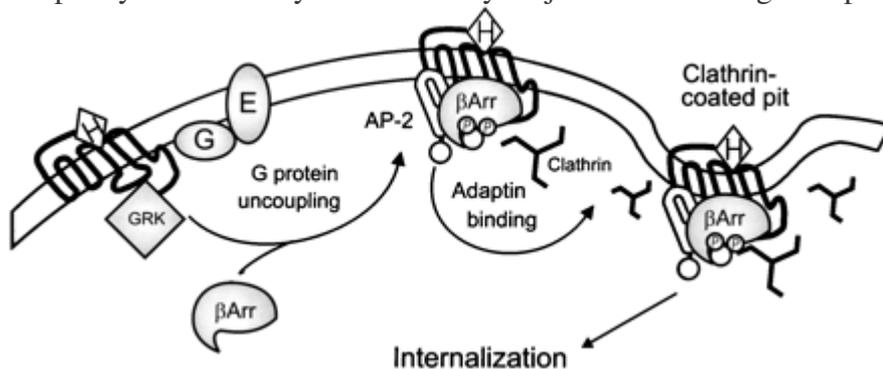
Interactions avec le cytosquelette d'actine

b) Exemple de l'endocytose à récepteurs (R7TM)

- Intervention de récepteurs (à 7 domaines transmembranaires : R7TM) couplés aux protéines G (Protéines GTPasiques membranaires). Leur phosphorylation par une GRK (G protéines Receptor cupled Kinase) permet la fixation à la bêta arrestine qui, via la protéines AP2 (Arrestine binding protein), fixe la clathrine en réseau hexagonal type nid d'abeille

- Structure des arrestines : 400 acides aminés
- Augmentation d'un facteur 30 des arrestines pour le R phosphorylés
- Par encombrement stérique, détache les Protéine G du Récepteur
- Par association du domaine C terminal de l-arrestine : association avec β adaptines qui favorisent fixation et polymérisation de clathrine : endocytose

- Il peut y avoir endocytose sur R n'ayant jamais fixé le Ligand : pool de réserve!



3- Diversité des modalités de l'endocytose

a) Phagocytose (vacuoles >1 μ m)

Cf. Doc. n°4

b) Pinocytose (vacuoles >0,1 μ m ou 100 nm)

- Cas des cellules acineuses pancréatiques pour les nutriments type acides aminés ou sucres par exemple
- 3 types d'endocytose : à puit de clathrine (diamètre de 120 nm), sans puit de clathrine (diamètre 100 nm) ou à cavéole (diamètre 50 à 80 nm) dont les mécanismes sont moins bien connus

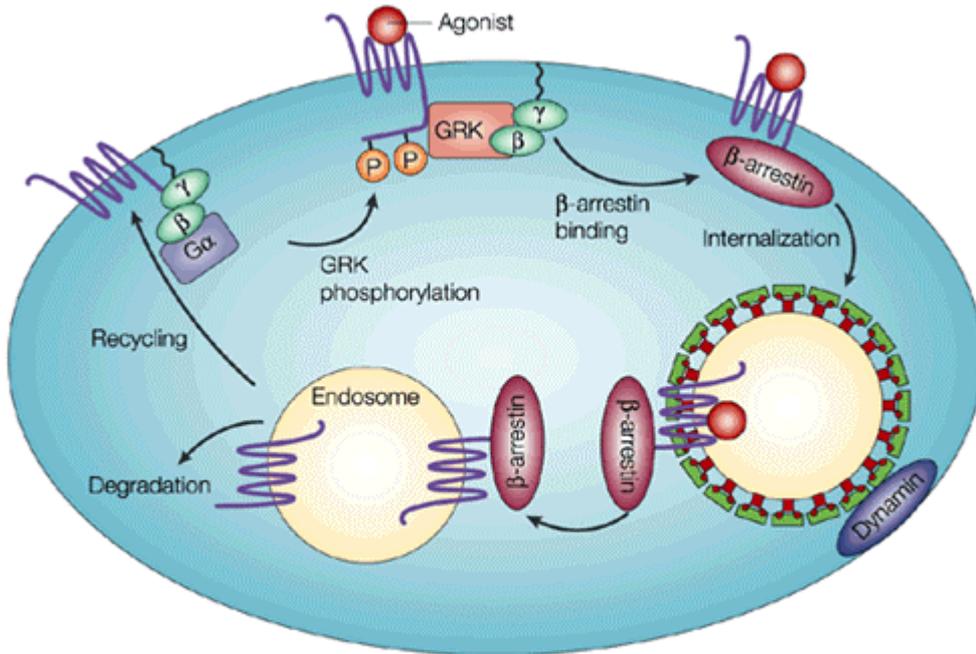
cf. Doc. n°3 (en haut)

- Cas particulier du ravitaillement des cellules en cholestérol : modalité de l'endocytose des LDL (Low Density Lipoprotéin) prenant en charge le cholestérol

cf. Doc. n°3 (en bas)

4- Devenir des vésicules d'endocytose

- Fusion avec système endosomal : endosome précoce ou de tri
 - La baisse du pH vésiculaire (de 7 à 5 environ) modifie l'affinité des récepteurs pour leur ligand qui se détache
- cf. Doc. n°5



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

- Formation d'endosome ou vésicules de recyclage d'une part, endosome tardif pouvant fusionner avec réseau golgien ou lysosomal d'autre part.

5- Modulation de l'activité d'endocytose

a) Désensibilisation

Mise en évidence

- 1979 : diminution de reconnaissance à la surface des érythrocytes de grenouilles après traitement adrénérgique
- Visualisation par immunocytochimie dirigée contre épitope des récepteur associé à Green Fluorescent Protéine (GFPs) sur cellules vivantes et en direct (dynamique).
- Vitesse : $t_{1/2} = 20$ à 90 min selon le type de récepteur

Principe

- Par diminution du nombre des récepteurs membranaires (déjà recrutés donc en cours de recirculation)
- Par phosphorylation des GPCR (G protein coupled receptor; R7TM par ex) qui deviennent moins affines pour le ligand

Mécanisme de phosphorylation des GPCR

- Phosphorylations sur Thréonines et Sérines de 3^{ème} boucle cytoplasmique et sur extrémité C terminale
- Par PKC ou PKA sensibles à AMP_c, DAG ou Ca²⁺
- Par GRK :
 - A domaine RGS (Arginine / Glycine /serine)
 - 7 gènes connus dont GRK1 agit sur rhodopsine et GRK7 rétinien, GRK2 sur Recepteur β adrénergique A part GRK4, les autres sont distribués largement dans toutes les cellules)
 - agissent sur Protéine G, sur récepteur directement et même sur R non lié au ligand!
- Par autres kinases (β Arrestine Kinase, Tyrosines kinases par ex.)

Conséquences physiologiques de la désensibilisation

- évite réaction aiguë ou chronique de sur-stimulation des cellules cibles
- limite l'action des drogues utilisées en thérapie

b) Resensibilisation

cf. Schéma

- voie **rapide** par vésicule d'endocytose à récepteur (qq secondes) : forte activité phosphatasique libère Ligand et déphosphoryle GPCR
- voie **lente** (qq min.) par voie des lysosomes

c) Modulation de l'activité par dimérisation

- Certains Récepteurs couplés aux protéines G doivent obligatoirement être sous forme d'hétérodimère pour activer les Protéines G
- Cas des Recepteurs GABA-R1 et G2ABA-R2
 - GABA-R1 exprimé seul dans la cellule reste piégé dans vésicules golgiennes
 - GABA-R2 exprimé seul est membranaire de surface mais ne peut se lier à GABA ni activer les Protéines G
 - Sous forme d'hétérodimère : deviennent membranaire de surface, fixent GABA et activent protéine G
- Cas des autres GPCR : peuvent se dimériser et dans ce cas modifie fixation au ligand et préférence pour type de Protéine G

II. L'exocytose : renouvellement membranaire et sécrétion de matière

1- Mise en évidence de l'exocytose

- Observation statique : microscopie électronique (ici, à transmission) cf. Doc. n°7
- Observation dynamique indirecte : cf. expériences de Pallade sur coupe semi épaisses de pancréas et marquage pulse/chasse à leucine tritiée puis autoradiographie

2- Différents modalités de sécrétions

- cas de la cellule acineuse du pancréas : Déclenchée.
- Aspect qualitatif : Sécrétion sous l'effet d'un signal extérieur (hormone CCKPZ) reçu par récepteur membranaire protéique. Déclenche en général augmentation de [Ca²⁺] intracellulaire (notion de second messenger)
- Constitutive : Produits, fabriqués par le métabolisme cellulaire, émis en continu

3- Implication du cytosquelette dans l'exocytose

a) Guidage des vésicules

- Par microtubules associés à dynéine ou kinésine
- Mee : inhibition de l'exocytose par colchicine (bloque polymérisation des microtubules)

b) Rigidification de la cellule

- Mee : Exocytose sensible à cytochalasine D (l'inhibe) donc fait intervenir filaments d'actine
- Modélisation du réseau cytosquelettique attaché à la membrane plasmique : sur cortex érythrocytaire
- Mécanisme moléculaire : Intervention de la gelsoline activée par augmentation intracellulaire de Ca^{2+} : gelsoline détruit le maillage d'actine associé à la zonula adhérens et libère le passage des vésicules vers l'apex.

c) Aspect quantitatif du recyclage membranaire

- cellule acineuse du pancréas : $900 \mu m^2$ de membrane sont ajoutés côté apical lors d'un signal pour une surface normale de $30 \mu m^2$
- Macrophage ingère 100% de sa membrane en 30 min.

4- Régulation de la Fusion cellulaire ou du Kiss and run par la synaptotagmine

a) Principe de la Fusion cellulaire et régulation par synaptotagmine

- SNARE (protéine transmembranaire) reçoit SNAP (Soluble NSF Attachment Protéine) = récepteur membranaire
- Reçoit NSF (NEM sensitive Factor) tétramérique 4×76 kDa à activité ATPasique
- Néthylamide bloque fusion des vésicules d'exocytose
- Hydrolyse d'ATP par le NSF permet relargage de celui ci et assure fusion
- Importance du Ca^{2+} dans la régulation de l'exocytose : on travail sur des cellules dont la synaptotagmine I a été mutée sur le domaine C terminal C2A : l'exocytose est inhibée. La même expérience menée sur SynIV montre Syn I est 5 fois plus sensible que SynIV

b) Principe du Kiss and run et régulation par synaptotagmine

- Principe : il peut y avoir échange de matière entre la vésicule de sécrétion et le milieu extracellulaire sans fusion de la vésicule, qui se décrochera ensuite
- Mise en évidence : par mesure d'efflux de catécholamines par microampèremètre au niveau d'un pore de pseudo-fusion
- Importance du Ca^{2+} et de la synaptotagmine dans la régulation du phénomène : on travail sur des cellules dont la synaptotagmine IV a été mutée sur le domaine C terminal C2B : l'exocytose est inhibée