

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG

Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

présentée par

Magali Malacombe

En vue d'obtenir le grade de Docteur de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg I

Discipline :
Sciences du vivant

Spécialité :
Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Dynamique du cytosquelette d'actine au cours de l'exocytose
régulée dans les cellules neuroendocrines : étude des voies
effectrice et régulatrice de la protéine Cdc42**

Soutenue publiquement le 29 Novembre 2006 devant le jury composé de :

Mme le Dr. Barbara Winsor (Rapporteur interne)
Mr. le Dr. Thierry Galli (Rapporteur externe)
Mr. le Dr. Pierre Chardin (Rapporteur externe)
Mr le Pr. Olivier Rohr (Examinateur)
Mr. le Dr. Stéphane Gasman (Directeur de Thèse)

Je tiens à remercier:

Marie-France Bader, pour m'avoir accueillie au sein de son groupe lors de mon DEA. Elle m'a donné l'occasion d'intégrer une équipe dynamique et motivée, qui m'a donné envie de continuer en thèse.

Olivier Rohr, Barbara Winsor, Pierre Chardin et Thierry Galli, mes membres du jury, pour avoir fait de cette soutenance un moment inoubliable d'échanges scientifiques qui a, au final, été beaucoup moins stressant que ce que je le pensais. Je leur suis reconnaissante des discussions concernant le manuscrit, des modifications à lui apporter et du temps qu'ils m'ont consacré à l'occasion de cette soutenance.

Stéphane Gasman, mon directeur de thèse, dont je sais que l'encadrement scientifique rigoureux m'a permis de profiter et de rentabiliser au maximum ces trois années de thèse, avec un petit avant-goût en DEA. Merci de ta bonne humeur, de ta patience et je sais que malgré mes boulettes toujours différentes d'une semaine à l'autre, tu as toujours autant de cheveux qu'au jour de mon arrivée en 2002...

Valérie Calco, qui m'a encadrée avec beaucoup de patience (et un franc-parler bien à elle) pour m'apprendre tout ce que je sais de la bio. mol., du clonage et autres joyeusetés relatives à nos amis les plasmides. Les séances de travail étaient régulièrement ponctuées de fous-rires qui donnaient l'impression que nous étions ailleurs que dans un labo...

Nicolas Vitale (comme la carte); dont je partageais le bureau et auquel j'arrivais à soutirer quelques informations scientifiques au milieu de toutes les taquineries qu'il pouvait me dire... Nos échanges vifs se terminaient régulièrement par une blague... Mais heureusement que **Maria Zeniou-Meyer** était là pour tempérer les facéties de Nicles et redonner un peu de sérieux et de calme à ce bureau bien agité. Merci du temps que tu as passé à me ré-expliquer ce que je ne comprenais pas ou que j'avais oublié...

Nancy Grant pour m'avoir aidé sur beaucoup de points, tant scientifiques que personnels. Je te suis très reconnaissante de m'avoir guidée quand j'étais seule au Canada et pour t'être si bien occupée de moi.

Mara Ceridono pour notre collaboration sur le projet intersectine mais aussi pour les discussions au cours de la préparation de cette thèse. Je sais que c'est dur d'être une fille du sud et de vivre en Alsace, on se comprenait bien lors des hivers interminables et pluvieux...

Jaroslava Ciesielski-Treska pour sa bonne humeur permanente et communicative, **Sylvette Chasserot-Golaz** pour sa gentillesse et ses conseils en imagerie, **Gaby Ulrich** pour sa grande rigueur qui m'a permis de travailler dans de bonnes conditions.

Yann Humeau et Frédéric Doussau qui ont su, à l'instar de **Bernard Poulain**, me parler des SNARE et me fournir une aide précieuse pour l'écriture de ce chapitre. Je dois avouer que sans eux, j'aurais eu du mal à faire le point sur ce sujet épineux. Merci beaucoup à vous deux pour votre contribution en images (c.f thèse de Yann...) à ce manuscrit.

Mes compagnons de paillasse ou d'étage, sans qui la vie au labo aurait été bien triste... **Emeline et Stella**, avec lesquelles j'ai beaucoup partagé, et qui m'ont énormément aidée dans les derniers moments de ma rédaction; **Fanny, Matthias, Aurélie**, les filles de l'équipe

Pfrieger, **Isa**, **Aurore** et **Céline S**, **Céline M** et ses acolytes du 3^{ème} étage, mais aussi ceux qui sont arrivés plus récemment et que je n'ai pas eu le temps de mieux connaître, comme **Frédéric Gambino**, **Etienne Lonchamp** ou **Pétra**, nouvelle recrue de la Vitale team.

Mes amis de Strasbourg et d'ailleurs, qui m'ont soutenue au cours de ces derniers mois. Merci à **Steeve** pour les moments de détente lors du marathon de la rédaction, à **Sandrine** et **Béregère** pour les longues conversations au téléphone dans les moments de déprime, à **Adeline** qui savait ce que je vivais pour l'avoir passé quelques mois auparavant, mais aussi **Carole**, **Maryem**, et **Yves**, qui m'a beaucoup encouragée dans la dernière ligne droite de la préparation de la soutenance.

Merci à ceux qui ont, de près ou de loin, aidée au cours de cette thèse.

Un grand merci à mes parents, qui m'ont toujours aidée et soutenue dans mes choix, avec une pensée spéciale pour ma grand'mère qui a contribué à ma réussite en me poussant à étudier.

Avant-propos

Le cytosquelette d'actine est un élément crucial à la survie cellulaire. En effet, il est certes responsable de la morphologie de la cellule et de son maintien, mais il est aussi impliqué dans des fonctions beaucoup plus dynamiques telles que le transport intra-cellulaire, la mobilité ou les phénomènes de division cellulaire. D'un point de vue morphologique, l'actine des cellules neuroendocrines forme un réseau dense sous la membrane plasmique qui présente la particularité de se restructurer lors des phénomènes de sécrétion. L'équipe du Dr Marie-France Bader s'est intéressée à la dynamique de l'actine et à sa régulation au cours du processus d'exocytose dans les cellules neuroendocrines. Lors de mon arrivée en DEA, le Dr Stéphane Gasman avait déjà démontré le rôle de RhoA dans la stabilisation de l'actine corticale et venait de suggérer l'implication éventuelle de Cdc42 au cours de la sécrétion dans les cellules neuroendocrines. Le but de mon projet de thèse fut alors d'étudier le rôle et la régulation de Cdc42. Afin de comprendre un peu mieux le fonctionnement de cet interrupteur moléculaire, je me suis focalisée sur la mise en évidence de ses voies effectrices et activatrices.

Ce manuscrit s'articule en quatre grandes parties. Dans la première partie, je décrirai le processus d'exocytose en général, en me focalisant sur le système neuroendocrine et en faisant quelques parallèles avec le système nerveux. J'inclurai dans ce chapitre une partie concernant les modèles cellulaires utilisés pour étudier la sécrétion neuroendocrine, à savoir les cellules chromaffines et les cellules PC12. J'en profiterai également pour traiter le cycle de vie du granule, étape par étape, depuis sa biogenèse dans l'appareil de Golgi jusqu'à son endocytose, en présentant les différentes hypothèses concernant les mécanismes moléculaires impliqués.

La seconde partie traitera de l'actine, élément crucial pour le bon déroulement de nombreux processus cellulaires. J'aborderai son organisation générale et les principaux facteurs de nucléation responsables de sa régulation. Parmi les régulateurs connus de la dynamique de l'actine se trouvent les protéines G de la famille Rho. Je leur ai consacré un chapitre, afin de présenter leur mode de fonctionnement et surtout de faire le lien entre ces protéines, l'actine et les processus de trafics membranaire et vésiculaire. Ce chapitre sur le trafic me permettra de présenter les rôles des protéines Rho et de l'actine au cours de l'exocytose, mais surtout de poser la question de sa fonction lors de ce processus, qui est encore mal définie à l'heure actuelle. C'est dans cette partie que je présenterai les résultats de

ma première publication, qui met en évidence une cascade moléculaire impliquant Cdc42, N-WASP et Arp2/3 dans la synthèse d'actine lors des étapes tardives de l'exocytose.

Dans la troisième partie, je présenterai les différents modes de régulation des protéines G monomériques. En effet, ces GTPases sont hautement régulées par plusieurs types de protéines, celles qui nous intéressent plus particulièrement étant les facteurs d'échange, responsables de l'activation des protéines G. C'est au cours de ce chapitre que sera introduite ma deuxième publication, portant sur la démonstration que l'intersectine, protéine d'échafaudage impliquée dans l'endocytose, est bien le facteur d'échange qui active Cdc42 au cours de l'exocytose.

Enfin, la dernière partie me permettra de discuter mes données concernant les GTPases de la famille Rho dans l'exocytose, le rôle de l'actine synthétisée au cours des étapes tardives de ce processus et les modes de régulations des protéines G, en les replaçant dans un contexte plus général.

Les données présentées dans ce manuscrit permettent d'avoir un aperçu général des mécanismes d'exocytose dans les cellules neuroendocrines mais aussi de mettre en évidence l'intervention indispensable des petites protéines G de la famille Rho, le rôle crucial de la dynamique de l'actine et la complexité moléculaire entourant ces phénomènes.

Première partie :

Généralités sur les mécanismes d'exocytose régulée

I- Introduction

Les deux principaux systèmes de commande de l'organisme, le système nerveux et le système endocrinien, utilisent tous deux la sécrétion pour la transmission de l'information. Le système nerveux exerce sa fonction de commande par l'intermédiaire de molécules chimiques appelées neurotransmetteurs tandis que les systèmes endocrinien et neuroendocrinien agissent grâce aux hormones libérées dans le sang. Les cellules endocriniennes sont regroupées au sein de structures anatomiquement distinctes, les glandes endocrines, qui sécrètent des hormones sous l'influence d'un stimulus approprié. Dans les glandes neuroendocrines telles que l'hypophyse ou la médullosurrénale, le stimulus déclenchant la libération d'hormones est un stimulus nerveux. En effet, ces glandes sont sous le contrôle du système nerveux central et la libération d'un neurotransmetteur par la terminaison nerveuse permettra à la glande neuroendocrine d'excréter ses hormones. Dans le système nerveux, la libération des neurotransmetteurs peut se faire entre deux neurones dans le cas de la propagation de l'influx nerveux, entre un neurone et une cellule musculaire au niveau de la jonction neuromusculaire, et enfin entre un neurone et une cellule endocrine pour déclencher la sécrétion d'hormones.

La sécrétion permet donc aux systèmes nerveux et endocrinien de libérer des hormones et des neurotransmetteurs. Elle correspond à l'ensemble des étapes qui vont de la synthèse à l'excrétion d'une molécule dans le milieu extra-cellulaire, en passant par son stockage et sa maturation dans le granule. L'exocytose représente la phase finale de la sécrétion, au cours de laquelle la membrane vésiculaire fusionne avec la membrane plasmique. Il existe deux types d'exocytose: l'exocytose régulée par le calcium, dont la concentration augmente suite à un stimulus externe, et l'exocytose non régulée par le calcium, plus couramment appelée exocytose constitutive. Le processus d'exocytose régulée est divisé en cinq étapes principales représentées dans la figure 1 et qui sont : i) le recrutement des vésicules jusqu'à la membrane plasmique, ii) l'accostage à proximité du site d'exocytose, iii) l'arrimage à la membrane plasmique, iv) l'amorçage qui correspond à la préparation à la fusion et enfin v) la fusion proprement dite.

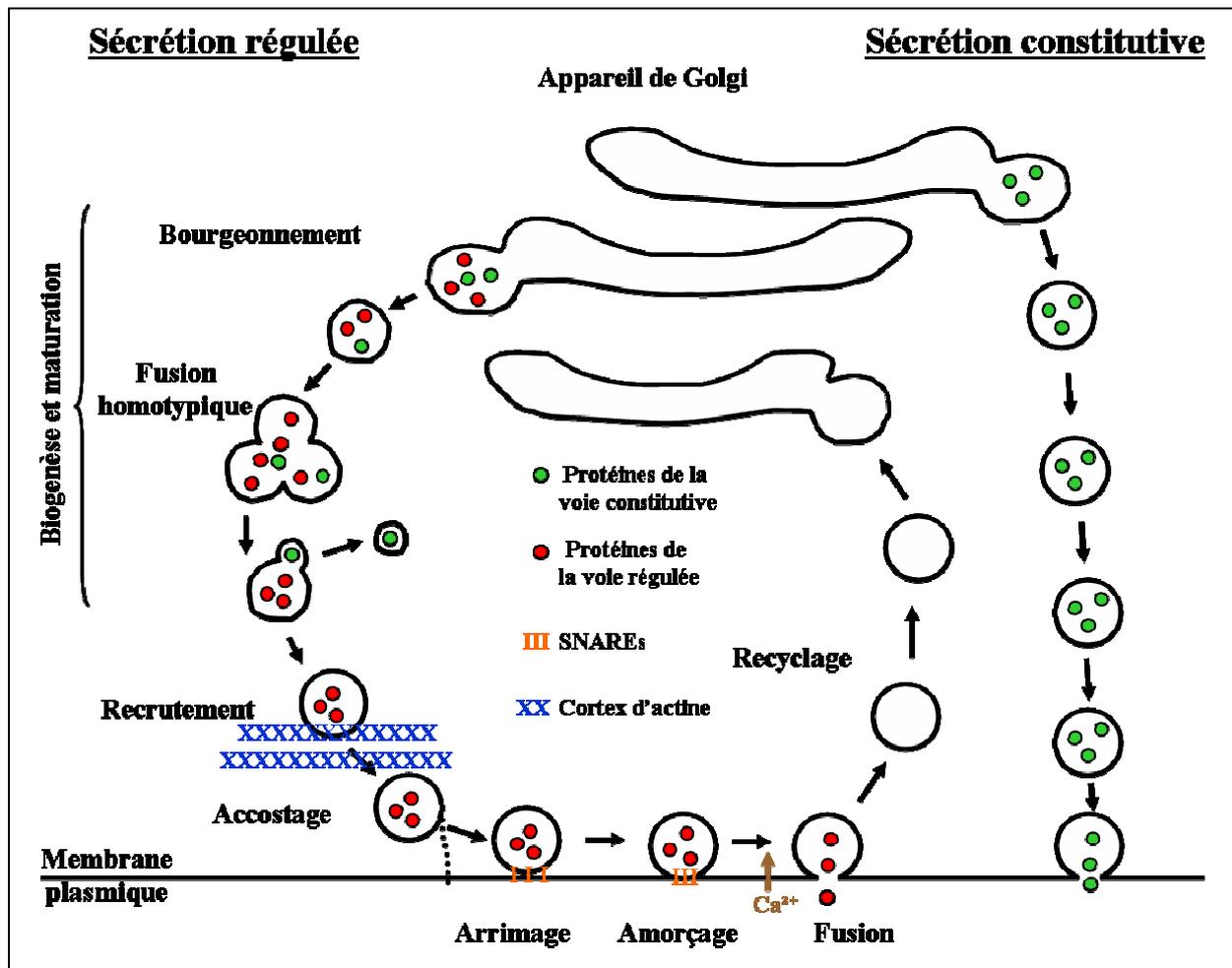


Figure 1: Les modes d'exocytose.

Lors de la sécrétion régulée, le granule est formé par bourgeoisement du compartiment trans-golgien. L'étape de maturation passe par la fusion des granules entre eux et la formation de petites vésicules permettant de séparer les protéines mal adressées. Le recrutement permet au granule de s'approcher de la membrane plasmique; à ce niveau-là, les étapes successives d'accostage, d'arrimage et d'amorçage lui permettront d'être prêt à fusionner. Une fois le contenu vésiculaire libéré après déclenchement de la sécrétion par l'entrée de calcium, le granule est recyclé et il repart vers l'appareil de Golgi. Chaque étape sera développée au cours du chapitre "Le cycle de vie du granule".

Dans le cas de la sécrétion constitutive, les granules ne subissent pas toutes les étapes décrites pour les granules de sécrétion. Ils vont directement fusionner avec leur compartiment cible.

L'exocytose est un processus universel que l'on retrouve dans toutes les espèces eucaryotes, et dont les mécanismes moléculaires sont hautement conservés d'une espèce à l'autre (Ferro-Novick and Jahn, 1994).

II- Les organites de l'exocytose

Les molécules de l'information sont stockées dans des organites spécialisés. Dans les cellules endocrines et neuroendocrines, les organites contenant les hormones sont appelées granules de sécrétion (GS) ou vésicules à cœur dense (LDCV pour Large Dense Core

Vesicle). Dans les neurones, ce sont les vésicules synaptiques qui contiennent les neurotransmetteurs.

La matrice des granules de sécrétion contient divers types de molécules comme des ions, de l'ATP, des enzymes, des peptides, des hormones... Le nombre de granules de sécrétion varie en fonction de l'espèce et du stade de développement de l'animal. Ils sont très nombreux dans les cellules endocrines (25 000 à 30 000 granules dans une cellule chromaffine bovine (Vitale *et al.*, 1995)) et sont aussi retrouvés dans certains neurones mais en moindre proportion.

Des études en microscopie électronique ont permis d'obtenir de nombreuses informations concernant ces organites. Leur taille peut varier de 60 à 300 nm de diamètre, et ils apparaissent opaques du fait de la forte concentration protéique et peptidique de la matrice granulaire (figure 2).

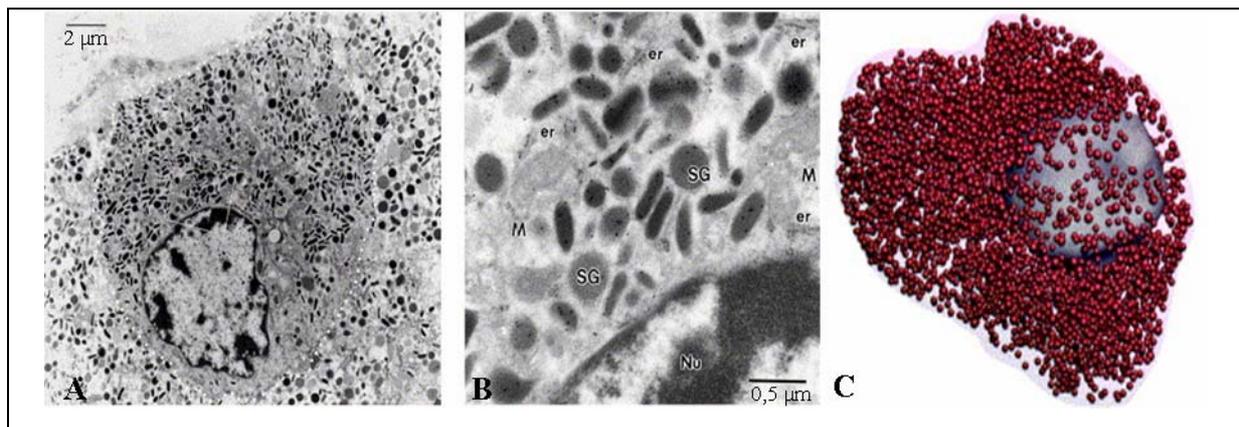


Figure 2: Les granules de sécrétion vus en microscopie électronique.

A: vue en microscopie électronique d'une cellule chromaffine de bœuf

B: grossissement montrant les granules de sécrétion

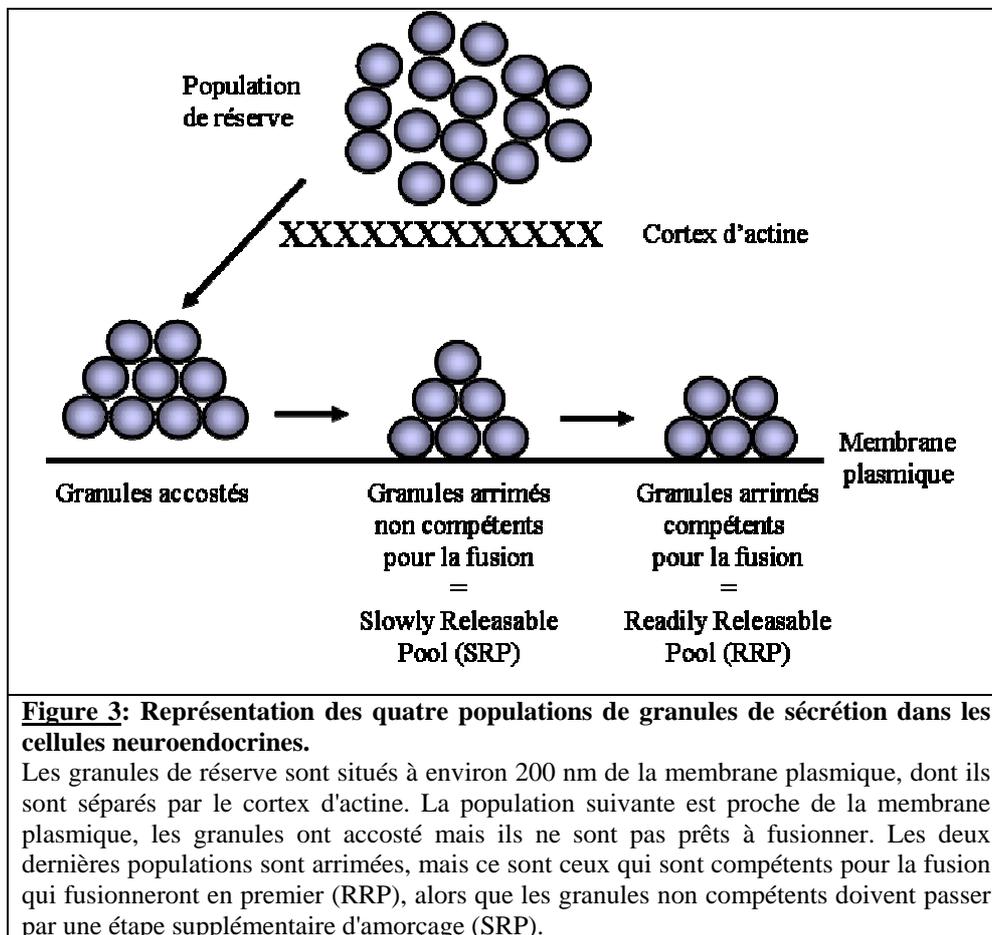
M: mitochondrie, SG: granule de sécrétion, er: réticulum endoplasmique, Nu: noyau

C: représentation schématique en trois dimensions de la disposition des granules de sécrétion dans une cellule chromaffine.

(Huh *et al.*, 2005)

La répartition des granules n'est pas homogène. Les premières études réalisées sur des cellules chromaffines et hypophysaires montraient que les granules étaient divisés en deux populations (Parsons *et al.*, 1995; Vitale *et al.*, 1995). Une première population, qui représente à peine plus de 1% des granules contenus dans la cellule, se trouve déjà arrimée au niveau de la membrane plasmique. La seconde population, beaucoup plus importante, est située à plus de 200 nm de la membrane plasmique et représente les granules de réserve. Ces granules sont maintenus à cette distance par un réseau d'actine qui doit être déstructuré pour permettre l'accès à la membrane plasmique (voir chapitre "Régulation de la dynamique de l'actine").

Toutefois, la combinaison des mesures de capacitance avec libération de calcium cagé par photolyse a permis d'affiner ces observations et de mettre en évidence trois sous-populations distinctes (voir figure 3) parmi les granules de sécrétion proches de la membrane plasmique dans les cellules neuroendocrines (Becherer and Rettig, 2006).



Une première population correspond à des granules arrimés et compétents pour la fusion, donc immédiatement libérables: c'est le RRP (pour Readily Releasable Pool). Ces granules sont libérés dans un délai de 20 à 40 ms suivant la stimulation. La seconde population, le SRP (pour Slowly Releasable Pool), est composée de granules arrimés mais incompétents pour la fusion. Il leur manque une étape d'amorçage et c'est pour cette raison qu'ils ne peuvent fusionner que dans un délai de 200 ms après la stimulation (pour revue, voir Sorensen, 2004). Enfin, la troisième population sert à approvisionner les RRP et SRP ; ce sont des granules proches de la membrane plasmique mais qui y sont rattachés de façon lâche et réversible. On peut penser qu'il n'y a pas d'ordre de passage particulier entre les granules, mais au cours de travaux utilisant des protéines cargo fluorescentes changeant de couleur en fonction du temps, Duncan et collaborateurs ont montré de façon intéressante que les granules

de sécrétion les plus "jeunes" étaient majoritairement situés près de la membrane plasmique (au niveau du RRP), plutôt immobiles, et qu'ils sont prioritaires pour la fusion alors que les granules plus anciens sont plus mobiles et situés au niveau cytoplasmique (Duncan *et al.*, 2003).

Dans les neurones, on retrouve une organisation des vésicules synaptiques relativement similaire à celle des granules de sécrétion. Ce sont de petits organites, de taille relativement homogène (environ 50 nm de diamètre) et qui apparaissent transparents au microscope électronique. Ils contiennent les neurotransmetteurs, qui peuvent être de natures très diverses (voir tableau 1).

Tableau 1: Les différents types de neurotransmetteurs

Nature	Acides aminés	Catécholamines	Neurotransmetteurs classiques	Peptides divers
Exemples	Glutamate Aspartate	Adrénaline, Noradrénaline, Dopamine	Acétylcholine, ATP, Adénosine, Sérotonine, Histamine	Opioïdes, VIP, glucagon, NPY vasopressine, etc

Ces vésicules peuvent être divisées en trois populations (Rizzoli and Betz, 2005). Les vésicules de réserve représentent 80% à 90% des vésicules présentes dans la terminaison synaptique et ne semblent pas être mobilisables dans des conditions physiologiques. La deuxième population contient 5% à 20% des vésicules et correspond à la population de recyclage. Cette population est continuellement approvisionnée par des vésicules nouvellement recyclées et elle permet d'entretenir la libération lors d'une stimulation physiologique. Enfin, la dernière population est celle des vésicules prêtes à être libérées (RRP+SRP) et ne représente que 0,1% à 2 % de la population totale. Ces vésicules se trouvent au niveau de la zone active (site d'exocytose) et cette réserve est rapidement épuisée après des stimulations à hautes fréquences (stimuli non physiologiques).

III- Cellules chromaffines et PC12: deux modèles de choix pour l'étude de la sécrétion neuroendocrine

La sécrétion est un phénomène répandu dans de très nombreux types cellulaires, ce qui permet de l'étudier sur des modèles relativement variés. Le pancréas est sujet à de très nombreuses études du fait de toutes les pathologies en relation avec la sécrétion d'insuline,

phénomène étudié sur les cellules β pancréatiques en culture mais aussi sur les lignées HIT ou MIN 6. Toujours dans un contexte pathologique, les cellules sanguines sont concernées par les phénomènes de sécrétion lors de réponses immunitaires, comme les mastocytes, les neutrophiles ou encore les basophiles. Les cellules des glandes parotides avec la sécrétion salivaire, la lignée BON (cellules entérochromaffines) ou encore celles des poumons avec la sécrétion de surfactant sont aussi étudiées. Il ne faut pas oublier de citer les neurones, dont on étudie les mécanismes de libération des différents neurotransmetteurs. Parmi les cellules neuroendocrines, en plus des cellules pancréatiques, on retrouve les cellules de l'hypophyse comme les lactotrophes ou les mélanotrophes. Enfin, les cellules chromaffines de la glande surrénale avec la lignée cellulaire PC12 sont un bon modèle d'investigation de la sécrétion neuroendocrine des catécholamines. Je vais développer un peu plus ces deux types cellulaires dans la mesure où ils constituent les modèles que nous utilisons au laboratoire.

Les cellules chromaffines sur lesquelles nous travaillons sont issues de la glande surrénale de boeuf. Cette glande, située au dessus de chaque rein, est constituée d'une partie corticale en périphérie et d'une partie médullaire au centre. La partie corticale de la glande surrénale est responsable de la libération d'hormones stéroïdes telles que les gluco- et les minéralo-corticoïdes ainsi que les hormones androgènes. La partie médullaire contient les cellules chromaffines, qui peuvent libérer des protéines de la famille des chromogranines ainsi que de nombreux peptides tels que des opioïdes, des hormones telles que les catécholamines, le facteur atrial natriurétique, la somatostatine,... (pour plus de détails voir tableau 2 et figure 4).

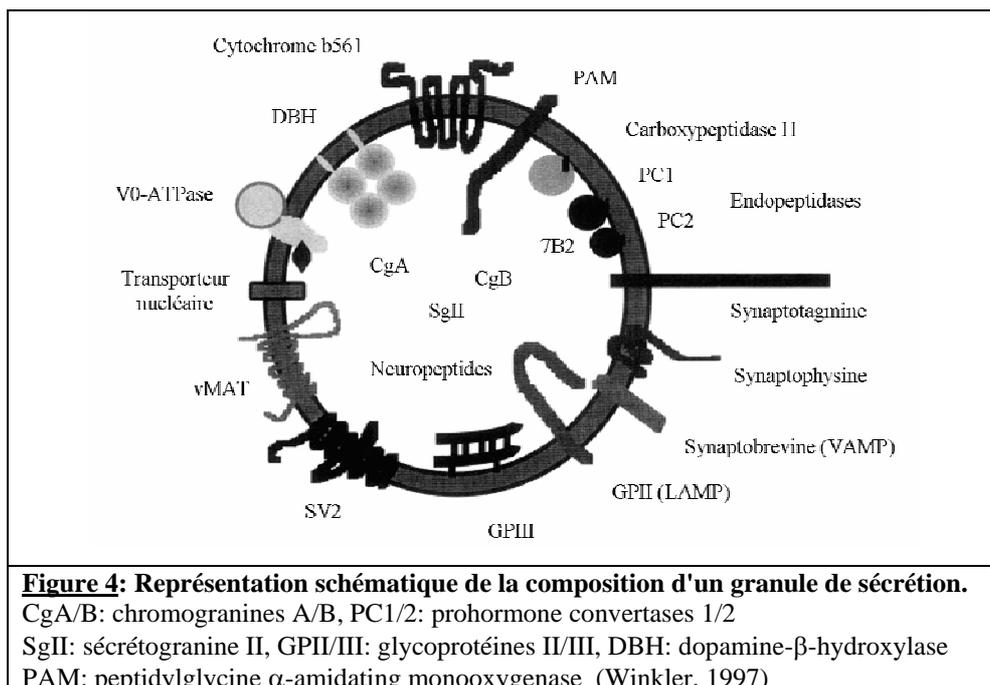


Tableau 2: Principaux constituants des granules chromaffines (Winkler, 1997)

Composition de la matrice du granule	
Catécholamines	Adrénaline, noradrénaline, dopamine - concentration totale: 0,6 à 0,8 M
Nucléotides	ATP (100 à 120 mM), AMP, ADP, GTP, GDP, UDP
Ions	Calcium (25 à 40 nm), sodium, magnésium, phosphate
Peptides	Enképhalines/proenképhalines, neuropeptide Y, substance P, somatostatine, VIP, neurotensine, ANF, galanine, ...
Cofacteurs	Acide ascorbique (environ 22mM)
Enzymes	DBH (dopamine- β -hydroxylase), enképhalinase, acétylcholinestérase
Protéines	Chromogranines A et B, sécrétogranine II
Composition de la membrane du granule	
Lipides	Cholestérol, phospholipides, gangliosides, lysophosphatidylcholine
Protéines	Transporteurs de catécholamines, nucléotides, calcium – échangeur Na/Ca Cytochrome b561, DBH, H ⁺ ATPase I & II, NADH oxydoréductase, phosphatidylinositol 4-kinase; glycoprotéines II, III; fodrine, α -actinine Protéines G ₀ , Rab3, RhoA; synaptotagmine, synaptobrevine

Ces cellules sont particulièrement utilisées comme modèle d'étude de la sécrétion neuroendocrine. En effet, elles sont soumises à un contrôle nerveux passant par le système orthosympathique : les terminaisons cholinergiques font synapses avec les cellules chromaffines, et celles-ci sécrèteront dans le sang des catécholamines en réponse à une stimulation nerveuse.

In situ, les cellules chromaffines sont polarisées. Leur pôle apical est connecté aux terminaisons nerveuses du nerf splanchnique et leur pôle basal est en contact avec les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Lorsque l'influx nerveux est transmis *via* ce nerf, la terminaison connectée à la glande va libérer de l'acétylcholine qui, en se fixant sur les récepteurs nicotiques/muscariniques, déclenchera la sécrétion du contenu des granules de sécrétion (figure 5). Une fois dans le sang, les hormones et peptides libérés circuleront de façon à atteindre les organes cibles. Les effets physiologiques très variés des catécholamines sont ceux retrouvés dans une situation de stress, à savoir entre autre une tachycardie, l'augmentation de la glycémie, l'érection des poils, le relâchement des muscles intestinaux, la dilatation de la pupille ...

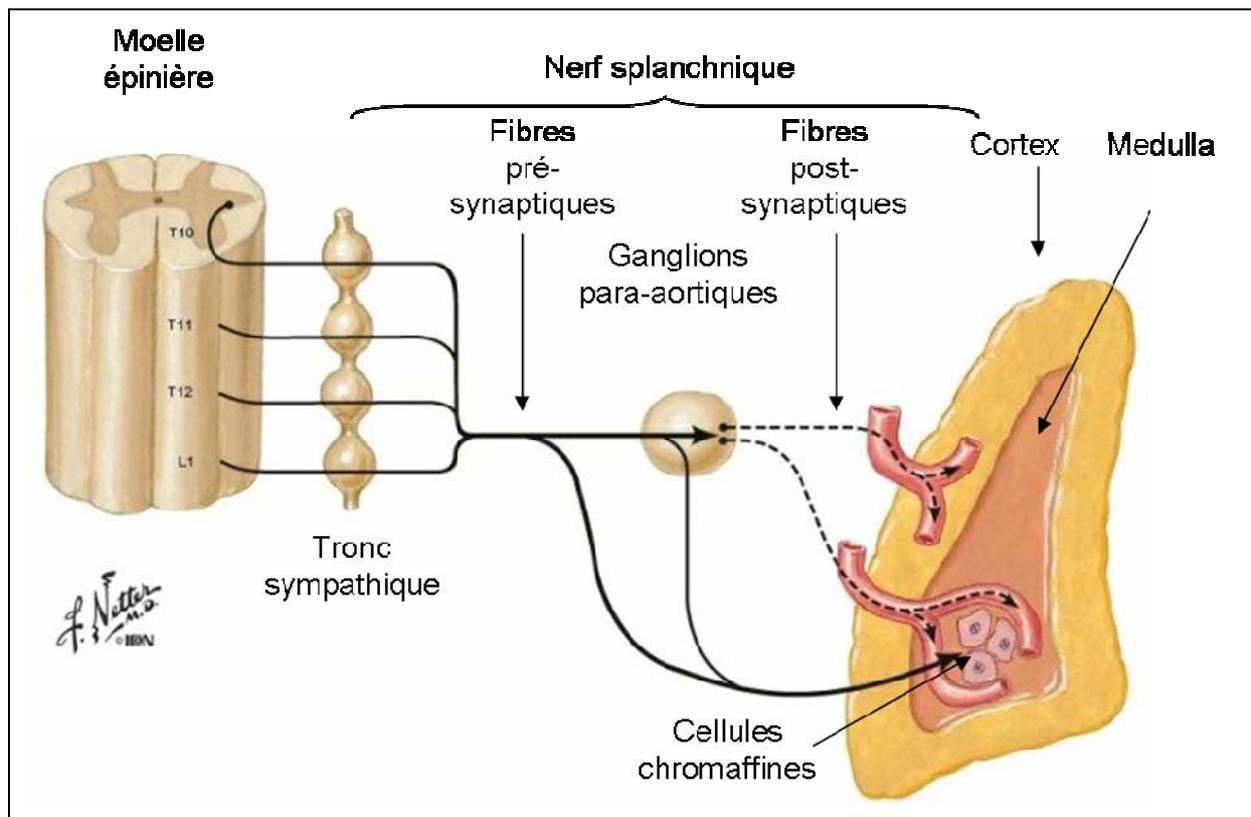


Figure 5: Innervation de la glande surrénale.

Les fibres nerveuses du nerf splanchnique innervent directement la région médullaire de la glande. Elles libèrent de l'acétylcholine qui stimulera les récepteurs nicotiniques des cellules chromaffines, déclenchant ainsi la libération du contenu granulaire dans le sang.

(source: <http://www.netterimages.com/>)

La cellule chromaffine bovine est un modèle de choix pour l'étude de la sécrétion neuroendocrine pour plusieurs raisons : i) la mesure de la sécrétion des catécholamines peut être pratiquée sur des cellules uniques par ampérométrie, technique qui présente l'intérêt de pouvoir décomposer les différentes étapes de l'exocytose, ii) de par sa taille relativement importante, elle est facile à aborder par une approche électrophysiologique mais aussi pour l'imagerie en microscopie à onde évanescente pour l'étude des phénomènes juxta-membranaires, iii) la culture, à partir de glandes bovines, permet d'obtenir un grand nombre de cellules, iv) la nature embryologique de la glande chromaffine (dérivée neurale) permet d'établir des liens avec les phénomènes ayant lieu dans les neurones, et ainsi d'élaborer des hypothèses de travail à partir d'éléments décrits dans le système nerveux central. Toutefois, la cellule chromaffine a certains inconvénients: les cultures peuvent présenter des variabilités d'une fois sur l'autre, et comme toutes les cellules issues de cultures primaires, elles sont difficilement transfectables. C'est pour cette raison que nous travaillons aussi en parallèle sur les cellules PC12.

Les cellules PC12 appartiennent à une lignée cellulaire issue d'un phéochromocytome, une tumeur de la glande médullosurrénale. Cette pathologie a pour conséquence une sécrétion accrue de catécholamines qui se traduit par une hyper-tension artérielle quasi-constante ainsi que des céphalées, des sueurs et des palpitations.

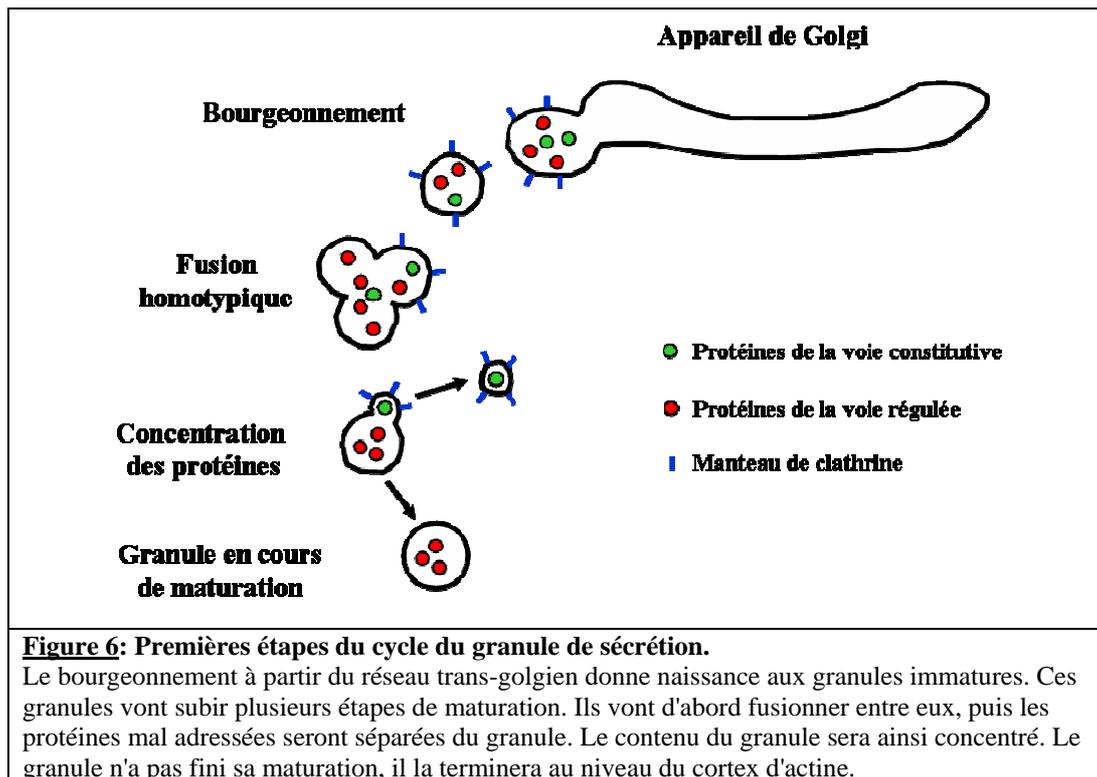
La lignée tumorale PC12 a été établie par Greene et Tischler en 1976 (Greene and Tischler, 1976). Cette tumeur touche la population noradrénergique de la glande surrénale de rat. Les cellules PC12 possèdent des granules de sécrétion à l'instar des cellules chromaffines, mais en quantité moindre. Elles peuvent aussi adopter un phénotype neuronal en réponse à un traitement au NGF (Nerve Growth Factor) : elle développent alors des neurites, expriment les neurofilaments et présentent des vésicules synaptiques situées au niveau des extrémités des prolongements (Tao-Cheng *et al.*, 1995).

Les PC12 présentent un grand intérêt dans l'étude de la sécrétion neuroendocrine car elles possèdent une machinerie intra-cellulaire nécessaire à l'exocytose comparable à celle présente dans les cellules chromaffines. Du fait que ce soit une lignée, leur culture est bien plus aisée et l'on peut arriver à obtenir une certaine constance d'une semaine sur l'autre. Il faut toutefois se méfier d'un éventuel changement de phénotype, ce qui se produit au bout d'un certain nombre de passages des cellules, et qui peut se traduire par des variations dans les taux de sécrétion ou un aspect différent (modification de l'adhérence). Enfin, le gros avantage de ce modèle est qu'il est facilement transfectable. Les taux de transfection sont corrects (environ 30%), ce qui permet d'évaluer efficacement les effets des protéines d'intérêt (voir matériel et méthodes).

IV. Le cycle de vie du granule de sécrétion

IV-1. Naissance d'un granule

Je présenterai ici brièvement les principales étapes de la genèse des granules de sécrétion qui se composent essentiellement du bourgeonnement du granule et de sa maturation (voir figure 6) (Molinete *et al.*, 2000 ; Meldolesi *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006)



IV-1-a. Biogenèse

Les granules de sécrétion sont formés par bourgeoisement à partir du réseau *trans*-golgien. Ce processus débute par l'agrégation sélective de protéines dites granulogènes, qui sont destinées à être empaquetées dans les granules de sécrétion. Ces protéines granulogènes sont les granines, famille à laquelle appartiennent les chromogranines. Il a été démontré que leur agrégation est possible du fait de conditions chimiques particulières retrouvées dans le compartiment golgien, à savoir le pH faible et la présence de calcium (Yoo, 1995). La déplétion en chromogranines dans les PC12 a pour effet de diminuer fortement le nombre de granules de sécrétion, confirmant ainsi l'importance du rôle de ces protéines dans la formation des granules de sécrétion (Huh *et al.*, 2003). Les protéines destinées à la sécrétion régulée sont triées grâce à des séquences peptidiques et des modifications post-traductionnelles permettant de les adresser spécifiquement vers une voie ou une autre. Au niveau de la zone d'agrégation, la membrane golgienne va bourgeoisement et permettre ainsi la formation de granules immatures. La formation des bourgeoisements serait dépendante de la clathrine (Tooze and Tooze, 1986) et suppose une force motrice favorisant le bourgeoisement. Cette force pourrait être générée par l'interaction entre les molécules contenues dans le granule (granines et prohormones) et les radeaux lipidiques. L'émergence du granule mature peut aussi être facilitée par la synthèse locale de lipides tels que le diacylglycérol et l'acide phosphatidique qui peuvent modifier la courbure des membranes.

IV-1-b. Maturation

Le granule néoformé va subir un processus complexe de maturation passant par trois étapes principales : la fusion homotypique des granules, l'élimination des protéines et des membranes non nécessaires et l'acidification de la matrice granulaire.

La première phase de la maturation présente la particularité de passer par une fusion homotypique faisant intervenir la syntaxine 6 et la synaptotagmine IV, et qui aboutit à des granules immatures de taille importante (Urbe *et al.*, 1998; Wendler *et al.*, 2001 ; Ahras *et al.*, 2006). Les protéines de la matrice granulaire n'étant pas forcément fonctionnelles, elles nécessitent une activation leur permettant par exemple de passer de l'état de prohormone à celui d'hormone (Orci *et al.*, 1986; Urbe *et al.*, 1997). Cette étape est possible grâce à l'acidification que subit la matrice granulaire. Le pH passe progressivement de 6,5 dans le compartiment golgien à 5,2 dans le granule mature grâce à l'action d'une pompe à protons (V-ATPase) (Wu *et al.*, 2001). Dans le cas du granule chromaffine, c'est à ce moment-là qu'il va compléter son contenu : les catécholamines présentes dans le cytoplasme sont accumulées à l'intérieur de la matrice *via* un transporteur spécifique qui agit en antiport de la V-ATPase, et permet ainsi d'accumuler les hormones à des concentrations relativement élevées. L'étape terminale de la synthèse d'adrénaline a lieu dans la matrice grâce à la dopamine- β -hydroxylase.

L'autre étape importante de la maturation est d'éliminer du contenu granulaire final les protéines emportées par erreur telles que les enzymes lysosomales ou les protéines de la voie constitutive. Ces protéines seront regroupées au sein de vésicules qui se détacheront du granule immature par un processus dépendant de la clathrine. Les granules immatures sont les seuls à posséder un manteau de clathrine, qui est réparti de façon hétérogène à sa surface : ces zones recouvertes de clathrine correspondent aux sites de bourgeonnement des vésicules contenant les protéines "sortant" des granules immatures (Orci *et al.*, 1985; Tooze and Tooze, 1986). Il est intéressant de noter que les travaux du groupe de Gerdes suggèrent que la plupart des étapes de maturation telles que l'élimination des protéines mal adressées ou la fusion homotypique se fasse au niveau de l'actine corticale (Rudolf *et al.*, 2001), après le transport des granules immatures vers la périphérie cellulaire.

IV-2. Acheminement en périphérie

Ce déplacement a lieu en deux temps, car les granules ne vont pas directement de l'appareil de Golgi aux sites d'exocytose.

IV-2-a. De l'appareil de Golgi vers la périphérie

Ce transport est sous contrôle des microtubules, servant de rails aux granules qui peuvent ainsi se déplacer grâce à des moteurs moléculaires. Cela a été mis en évidence en 1971 par Poisner et Bernstein au cours de la libération des catécholamines dans les cellules chromaffines (Poisner and Bernstein, 1971). Le groupe de Gelfand a par la suite démontré *in vitro* qu'il y avait un transport des mélanosomes le long des microtubules (Rogers *et al.*, 1997), ce qui a été confirmé quelques années plus tard par des travaux montrant que ces granules pigmentaires utilisent ce système pour se déplacer en périphérie cellulaire (Barral and Seabra, 2004). Toutefois, les mélanosomes ne sont pas les seuls organites concernés par ce transport utilisant les microtubules. En 2003, Neco et collaborateurs ont évalué par électrophysiologie et microscopie confocale les effets de drogues touchant la dynamique des microtubules et de l'actine sur des cellules chromaffines (Neco *et al.*, 2003). La déstructuration du réseau de microtubules inhibe la libération de catécholamines au cours des phases lentes de la sécrétion ainsi que lors de stimulations répétées, et elle a aussi comme conséquence de réduire la mobilité des granules situés au niveau du cytoplasme, dans la région péri-nucléaire, confirmant ainsi la nécessité d'un réseau de microtubules intact pour le déplacement des granules vers la périphérie.

IV-2-b. Du cortex d'actine vers les sites d'exocytose

Le granule a terminé sa maturation dans le cortex d'actine, il peut maintenant être utilisé pour la sécrétion. Lorsque le calcium entre dans la cellule à la suite du signal déclenchant l'exocytose, il y a une dépolymérisation de l'actine indispensable au mouvement des granules vers la membrane plasmique. Mais ce déplacement est-il un simple mécanisme de diffusion ou plutôt un processus actif qui dirige les granules vers une cible précise ? Des études utilisant la microscopie à onde évanescente (TIRFM) ont montré que dans certaines conditions, la dépolymérisation de l'actine par la latrunculine avait pour conséquence de diminuer la mobilité des granules (Lang *et al.*, 2000; Oheim and Stuhmer, 2000), mais ce résultat est aussi obtenu par incubation avec de la phalloïdine, qui fige le cytosquelette. De même, la déstructuration du cytosquelette d'actine par déplétion de l'ATP a pour effet une nette réduction des mouvements granulaires, dans les PC12 et dans les cellules chromaffines (Lang *et al.*, 2000; Allersma *et al.*, 2006). L'actine est donc liée à la mobilité des granules, et les moteurs moléculaires associés aux microfilaments pourraient être responsables de ces mouvements. Le principal candidat pour cette fonction est la myosine V, qui est associée aux

granules de sécrétion (Rose *et al.*, 2003; Varadi *et al.*, 2005). Les travaux de Desnos et collaborateurs ont montré que le complexe formé par la myosine V, la GTPase granulaire Rab27 et la protéine MyRIP qui lie Rab27 à la myosine V contrôle les mouvements des granules à proximité de la membrane plasmique (Desnos *et al.*, 2003), suggérant ainsi le déplacement actif des granules le long des filaments d'actine. L'implication de la myosine V dans le transport des granules de sécrétion a aussi été confirmée dans les cellules PC12 et β -pancréatiques (Rudolf *et al.*, 2003; Varadi *et al.*, 2005).

IV-3. A la membrane plasmique

Une fois arrivé à la membrane plasmique, le granule ne peut pas fusionner directement avec celle-ci. Il existe encore des étapes intermédiaires entre le moment où il se trouve proche de la membrane et celui où il va pouvoir libérer son contenu. La séquence spatiale et temporelle de ces étapes est relativement complexe et sujet à controverse depuis de très nombreuses années, et il est difficile de mettre tout le monde d'accord sur cette question. Dans un souci de clarté maximale, j'ai choisi de séparer cette partie en trois étapes : la mise en place des vésicules à proximité des sites d'exocytose que j'appellerai l'étape d'accostage (tethering), leur arrimage à la membrane plasmique (docking) et enfin l'étape permettant de rendre les vésicules compétentes pour la fusion (priming) (figure 7).

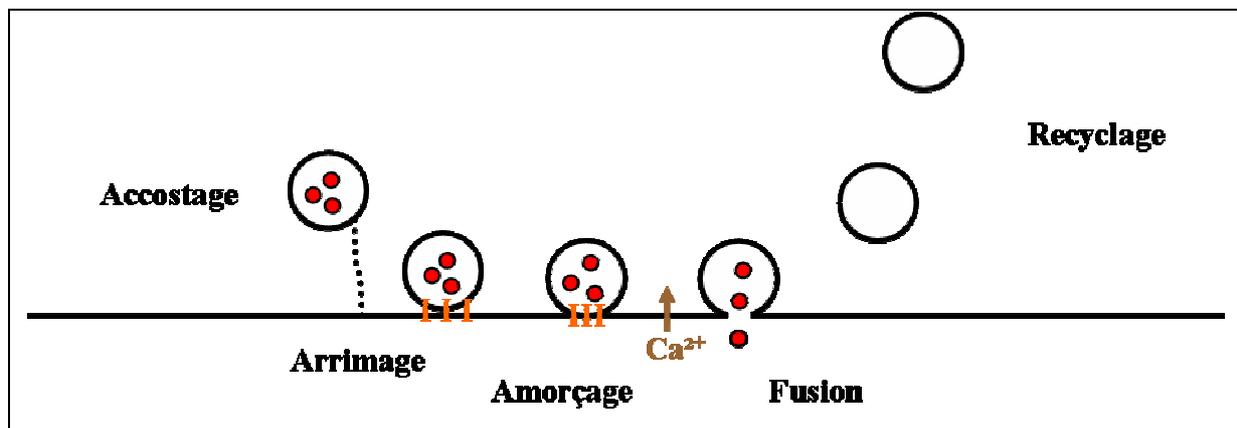


Figure 7: Etapes terminales de l'exocytose.

Le granule va s'approcher de la membrane plasmique. Il pourra accoster au niveau du site d'exocytose et s'y arrimer. Afin de pouvoir fusionner, le granule subira une dernière étape de maturation qui le rendra compétent pour la fusion. Après avoir libéré son contenu, le granule est capturé par endocytose et recyclé. Toutes ces étapes sont détaillées au cours des chapitres suivants.

IV-3-a. Accostage (tethering)

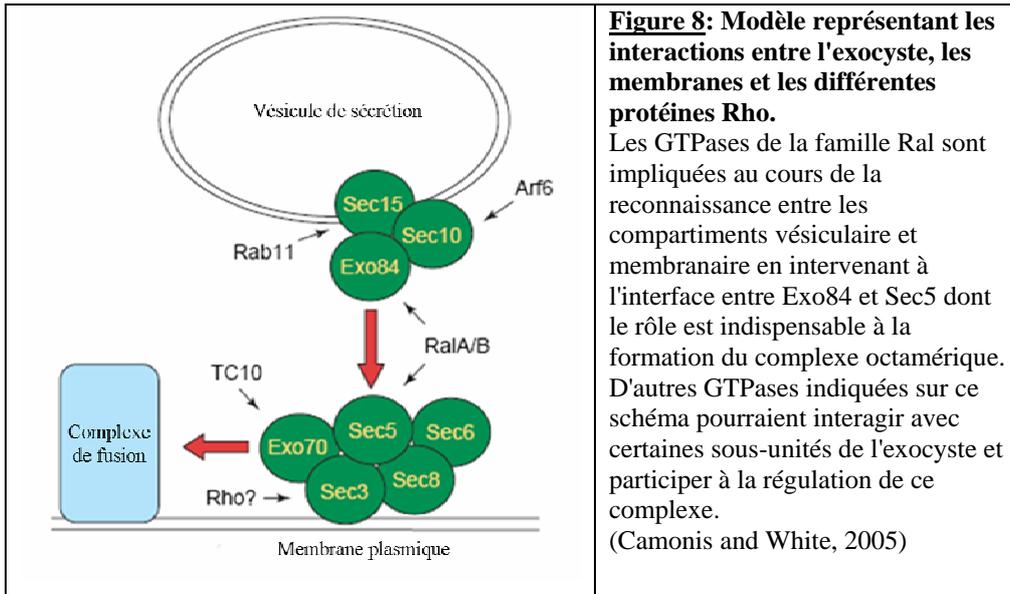
Les vésicules qui ont accosté sont caractérisées par leur position relativement proche de la membrane plasmique (en deçà des 200 nm). Elles ont été transférées à partir du pool de

réserve. L'étape d'accostage a pour but de mettre ces organites à leur place, i.e., à la membrane plasmique pour les granules de sécrétion ou les zones actives pour les vésicules synaptiques. Ce positionnement des granules implique la reconnaissance de la membrane cible avec laquelle ils vont fusionner, mais par quel moyen ?

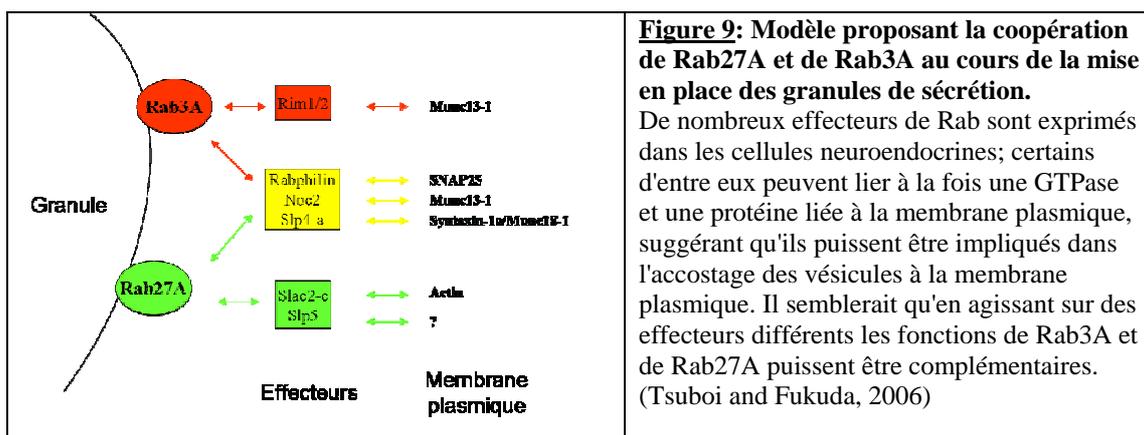
Le groupe de Rothman a identifié les SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Receptor*) et les a proposées comme marqueurs d'identité de la vésicule et de la membrane plasmique (Sollner *et al.*, 1993a; Sollner *et al.*, 1993b). Or, cette hypothèse a dû être révisée suite à la publication des travaux de l'équipe de Schiavo prouvant que les SNARE étaient les cibles de neurotoxines et démontrant ainsi leur rôle au cours des étapes plus tardives de l'exocytose (Schiavo *et al.*, 1992; Schiavo *et al.*, 1993). En effet, l'utilisation des toxines clostridiales a montré des défauts de sécrétion mais pas de changement dans la distribution des vésicules au niveau de la membrane plasmique (Hunt *et al.*, 1994; Broadie *et al.*, 1995), éliminant ainsi les SNARE en tant qu'identificateur de compartiments. Le mécanisme d'accostage est toujours sujet à débat mais plusieurs candidats sont proposés.

Un des candidats pour ce rôle de reconnaissance serait le complexe de l'exocyste, qui a été identifié à l'origine chez la levure grâce à une série de mutants thermosensibles qui présentaient des défauts de sécrétion. Il est composé de huit protéines (Sec3p, Sec5p, Sec6p, Sec8p, Sec10p, Sec15p, Exo70p et Exo84p) réparties entre les sites de fusion et les membranes des organelles, il joue un rôle important dans l'exocytose. Toutefois, chez les mammifères (qui possèdent tous les équivalents de toutes les protéines de ce complexe), sa localisation varie beaucoup en fonction du type cellulaire, de l'état de différenciation des cellules et il peut être impliqué aussi bien au cours de la sécrétion que dans la croissance dendritique, la synaptogenèse ou l'établissement de la polarité cellulaire (Hsu *et al.*, 2004). Les protéines de l'exocyste marquent les membranes vésiculaires et cible, mais exist-t-il d'autres protéines vésiculaires impliquées dans cette reconnaissance?

RalA, une GTPase de la famille Ras, est un candidat idéal pour cette fonction (figure 8). En effet, Moskalenko et collaborateurs ont démontré que Ral interagit directement avec l'exocyste via Sec5, que cette interaction est nécessaire à l'assemblage du complexe de l'exocyste et que Ral intervenait dans l'exocytose des cellules PC12 par l'intermédiaire de Sec5 (Moskalenko *et al.*, 2002). Toutefois, d'autres petites protéines G connues pour être impliquées dans l'exocytose et lier l'exocyste pourraient jouer ce rôle, comme Cdc42 (Zhang *et al.*, 2001) et Rho1 (Guo *et al.*, 2001), mais leur lien avec l'exocyste chez les mammifères reste encore à déterminer.



Parmi les protéines impliquées dans le trafic vésiculaire, Rab3 pourrait jouer un rôle dans la phase d'approche de la membrane plasmique. Au cours de leur dernière étude, Tsuboi et collaborateurs ont utilisé la microscopie à onde évanescente et les ARN interférence de Rab3A et Rab27A (figure 9). Cela leur a permis de mettre en évidence dans les PC12 l'intervention de ces deux protéines Rab dans la régulation de la mise en place des granules de sécrétion. L'analyse des phénotypes de cellules affectées par les différents ARN interférence a montré que Rab3A et Rab27A coopèrent au cours de la même étape sans toutefois que leurs fonctions ne soient redondantes, certainement par l'intervention de leurs effecteurs respectifs (Tsuboi and Fukuda, 2006).



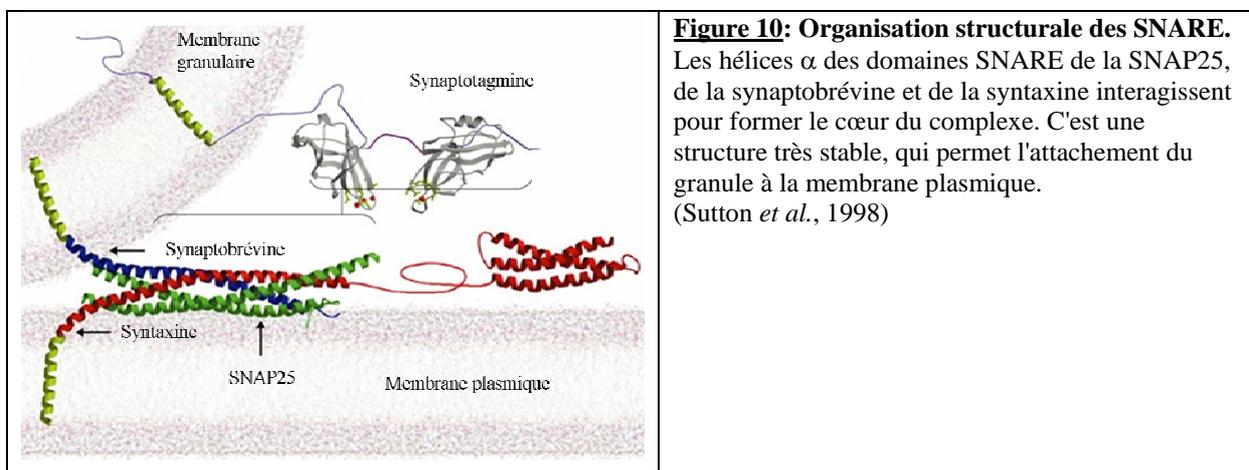
Toutefois, la localisation des granules au niveau de la membrane plasmique et à proximité des sites d'exocytose ne suffit pas à la fusion, et le fait que ces granules soient

incapables de fusionner spontanément signifie que d'autres étapes intermédiaires sont nécessaires.

IV-3-b. Arrimage à la membrane plasmique (docking)

Une fois les granules stockés à proximité des sites d'exocytose, une structure minimale est nécessaire à leur arrimage. Les analyses d'images obtenues par microscopie à onde évanescente sur des cellules chromaffines de souris ont permis de mettre en évidence différentes populations parmi les granules déjà localisées à la membrane plasmique. En effet, les granules possédant un « lien » physique faible avec la membrane plasmique restent moins longtemps (<1s) alors que ceux qui ont des liaisons (plus ou moins fortes) peuvent rester en place plus de 10s (Toonen *et al.*, 2006). Les granules qui sont visibles le moins longtemps et qui ont un lien plus faible pourraient ainsi correspondre aux granules accostés.

Les protéines SNARE ne semblent pas être impliquées au cours des phases précoces de l'exocytose, mais plutôt au cours des étapes d'arrimage et de fusion. Mises en évidence grâce à l'utilisation de différentes neurotoxines (Schiavo *et al.*, 1992; Schiavo *et al.*, 1993), ces protéines sont connues pour jouer un rôle important lors du processus d'exocytose mais elles sont aussi impliquées au cours des phénomènes intracellulaires mettant en jeu la fusion entre deux membranes (Jahn *et al.*, 2003). Le complexe SNARE est composé de trois protéines : d'une part la VAMP2/synaptobrevine, qui est vésiculaire (v-SNARE), et d'autre part la syntaxine1 et la SNAP25 (Synaptosomal Associated Protein of 25 kDa), qui sont situées sur la membrane plasmique (t-SNARE). Ces trois protéines présentent toutes un motif commun appelé motif SNARE, et l'association de ces motifs forme un faisceau de quatre hélices α parallèles qui constitue le cœur du complexe SNARE (figure 10).



Il semblerait toutefois que l'intégralité du complexe SNARE ne puisse être complètement formée dès l'arrivée du granule. En effet, l'interaction de la protéine Munc18 avec la syntaxine-1 lui donne une conformation telle qu'elle ne peut se lier avec les autres SNARE. Cela permettrait à la cellule de contrôler la fusion et de faire en sorte qu'une vésicule qui est prête à fusionner ne puisse le faire qu'après un ultime signal. Une hypothèse propose la formation progressive du complexe SNARE (figure 11) à partir des extrémités N-terminales de ces protéines qui permettrait, à la manière d'une « fermeture Eclair », de rapprocher les membranes cellulaire et vésiculaire (Sorensen *et al.*, 2006). Cependant, une étude récente suggère plutôt que l'assemblage du complexe SNARE soit un mécanisme concerté impliquant simultanément plusieurs sites d'interaction le long des protéines SNARE (Han and Jackson, 2006). Quelle que soit l'hypothèse retenue, l'association en *trans* (entre deux membranes différentes) de ces protéines permet d'attacher partiellement le granule à la membrane plasmique. Il reste évident que, malgré les très nombreuses études menées à ce sujet, le déroulement spatio-temporel de l'assemblage des SNARE et leur rôle exact restent sujets à controverses.

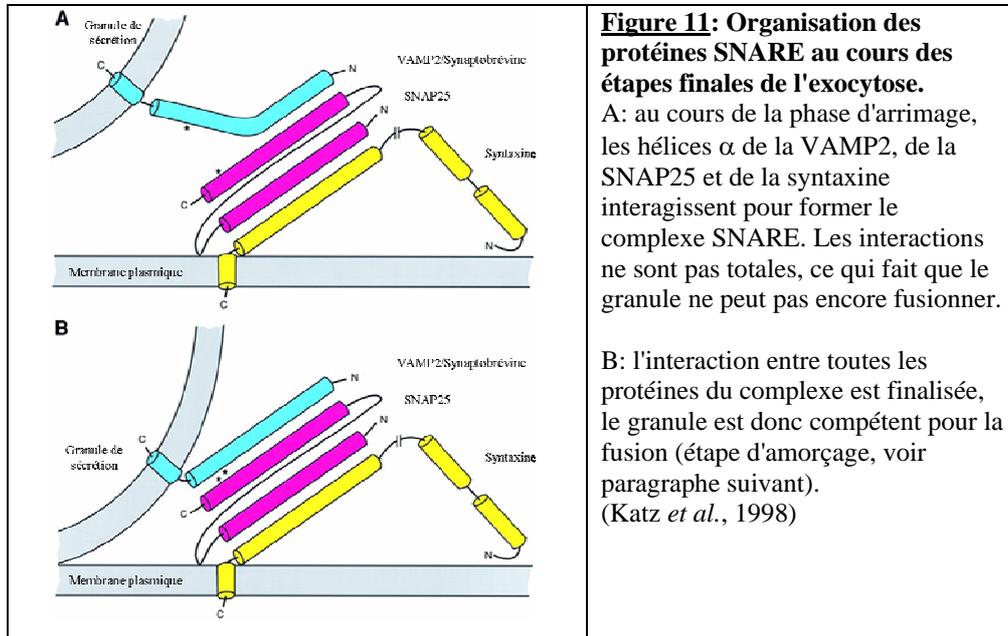


Figure 11: Organisation des protéines SNARE au cours des étapes finales de l'exocytose.
A: au cours de la phase d'arrimage, les hélices α de la VAMP2, de la SNAP25 et de la syntaxine interagissent pour former le complexe SNARE. Les interactions ne sont pas totales, ce qui fait que le granule ne peut pas encore fusionner.
B: l'interaction entre toutes les protéines du complexe est finalisée, le granule est donc compétent pour la fusion (étape d'amorçage, voir paragraphe suivant). (Katz *et al.*, 1998)

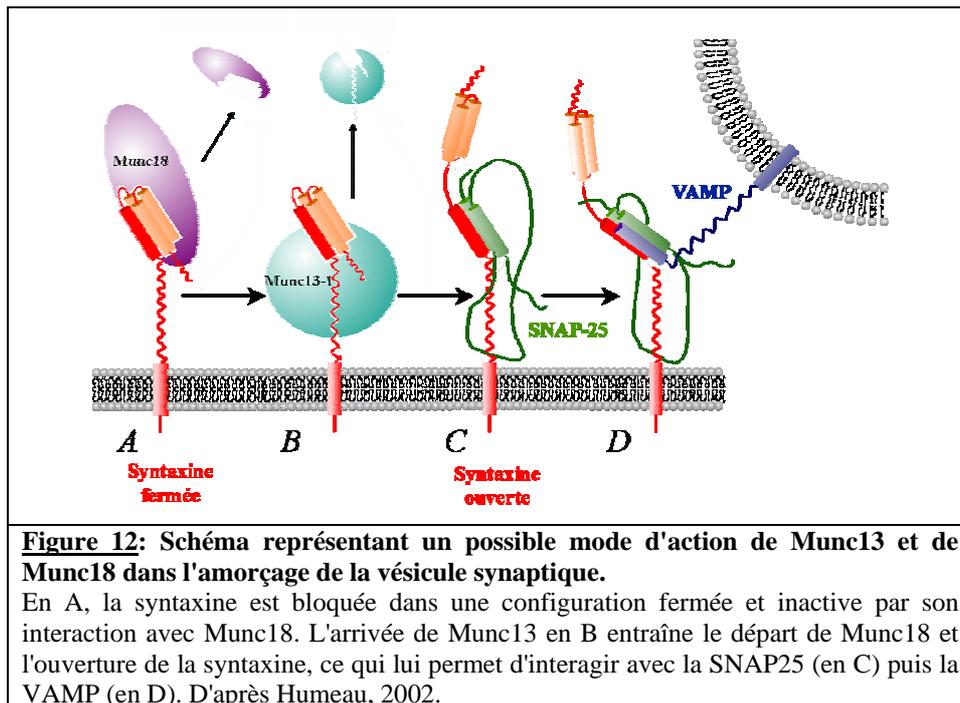
Les techniques d'imagerie plus perfectionnées, comme la microscopie à onde évanescente, ont donné la possibilité d'étudier la dynamique d'une vésicule située à moins de 200 nm de la membrane plasmique. Cette technique a été utilisée sur des cellules de souris knock-out pour la protéine Munc18-1, qui est soupçonnée de réguler les interactions entre les

protéines du complexe SNARE. Les auteurs ont démontré que cette protéine est capable d'interagir avec la syntaxine 1, mais aussi qu'elle est importante et permet d'établir une liaison plus forte entre le granule et la membrane plasmique, sans toutefois réussir à mettre clairement en évidence de quelle façon (Voets *et al.*, 2001). D'autres protéines sont connues pour être impliquées dans ce processus d'attachement des granules à la membrane plasmique. Le complexe de l'exocyste, qui aide à la mise en place des vésicules au cours de la phase d'accostage, serait un candidat intéressant pour jouer un rôle dans l'attachement proprement dit, mais il semblerait que son action se situe plus au niveau de l'accompagnement et du ciblage de la vésicule que de son attachement à la membrane plasmique.

IV-3-c. Préparation à la fusion ou amorçage (priming)

La frontière entre l'amorçage et l'arrimage est relativement étroite du fait qu'un simple changement d'interaction rendant les granules compétents les différencie. En effet, les granules sont positionnés, arrimés à la membrane plasmique, prêts à fusionner mais ils ne fusionnent pas. Pourquoi ?

En 1998, Weber *et al.* ont montré que l'incorporation de v-SNARE et de t-SNARE dans des liposomes est suffisante pour provoquer la fusion des différents compartiments (Weber *et al.*, 1998). La cellule doit donc faire en sorte de contrôler ces événements de fusion spontanée en les inhibant dans un premier temps pour pouvoir mieux les autoriser par la suite. Comme indiqué précédemment, Munc18-1 peut se lier à la syntaxine 1, et cette interaction donne à cette dernière une conformation l'empêchant de finaliser le complexe SNARE. Sachant cela, il est donc nécessaire qu'une autre protéine entre en jeu afin de permettre à la syntaxine 1 de se lier avec les autres SNARE et donc de former le complexe. Cette protéine serait Munc13, mise en évidence *via* des expériences de knock-out chez la souris, la mouche *Drosophila melanogaster* et le nématode *Caenorhabditis elegans* (Rettig and Neher, 2002). Il semblerait que l'arrivée de Munc13 entraîne le départ de Munc18, libérant ainsi la syntaxine qui pourra se lier à la SNAP25, puis à la VAMP. Toutefois, le mode exact de fonctionnement de Munc13 reste inexpliqué et il diffère en fonction de la nature des cellules. En effet, les mesures de libération de neurotransmetteurs sur divers types cellulaires provenant de souris n'exprimant plus Munc13-1, -2 et -3 ont montré des résultats divergents, suggérant que l'étape d'amorçage ne nécessite pas rigoureusement les mêmes acteurs dans toutes les cellules sécrétrices (Varoqueaux *et al.*, 2005). Il semblerait même que l'amorçage des granules de sécrétion dans les cellules chromaffines puisse se produire de façon constitutive, sans l'intervention d'un facteur essentiel (voir figure 12).



L'étape de préparation du granule pour la fusion est très régulée, et la protéine Rim est un de ces "garde-fous". Elle interagit spécifiquement avec la forme activée de Rab3 (Rab3-GTP), impliquée dans la mise en place des granules (Tsuboi and Fukuda, 2006) ; les mutants Rim chez la souris et chez *C. elegans* présentent un phénotype plus sévère que celui des mutants Rab3, suggérant une fonction de Rim allant au-delà d'un simple effecteur de Rab3 (Koushika *et al.*, 2001; Schoch *et al.*, 2002). Munc13 et Rab3A peuvent toutes deux interagir avec Rim, et ce au niveau du même site. La compétition des deux protéines serait le moyen de coordonner l'arrimage et l'amorçage. Dans un premier temps, l'arrivée des vésicules serait gérée par Rab3A, puis une fois la vésicule arrimée, Munc13 remplacerait Rab en se fixant à Rim, amorçant ainsi la phase de priming. Rim se trouve au bon endroit au bon moment du fait des liaisons multiples qu'elle a avec de nombreux acteurs de l'exocytose tels que la SNAP25, la synaptotagmine ou encore les canaux calcium (Li and Chin, 2003). De par ses interactions multiples, Rim est un régulateur clé dans l'organisation, la coordination et le contrôle de l'exocytose des vésicules synaptiques mais aussi des granules de sécrétion (Sun *et al.*, 2001).

D'autres protéines/complexes sont proposés pour réguler cette étape précédant la fusion, comme les complexines, la tomosyne, la snapine, qui pourraient agir en tant que régulateurs de l'association des SNARE, stabilisateurs du complexe formé, ou encore contrôler le passage à la fusion, mais les rôles ne sont pas toujours clairs pour toutes ces protéines (Becherer and Rettig, 2006).

Le complexe SNARE assemblé présente une grande stabilité qui suggère que sa formation fournirait l'énergie nécessaire à la fusion. A la fin de la fusion, les SNARE se retrouvent sur la même membrane : elles forment un complexe en *cis* qui sera dissocié via l'intervention de l'ATPase NSF combinée à son cofacteur SNAP (Jahn *et al.*, 2003). Cette dissociation est nécessaire à la réactivation des SNARE qui sont ainsi utilisables pour un nouveau cycle de fusion.

IV-3-d. Fusion

Le granule est arrimé, prêt à la fusion, il n'attend plus que l'ultime signal, celui qui déclenchera la fin du processus. Concernant cette étape, le seul élément sur lequel tout le monde s'accorde est qu'elle fait suite à une entrée de calcium. Le déclenchement de l'exocytose dans les neurones ou les cellules neuroendocrines ne requiert pas la même concentration en calcium. En effet, dans les cellules chromaffines, Augustine et Neher ont dialysé différentes concentrations calciques *via* une pipette de patch-clamp et ont mis en évidence que la concentration calcique seuil était de 0,3 μM (Augustine and Neher, 1992). En revanche, dans les neurones, la concentration seuil est beaucoup plus importante et doit atteindre 50 μM dans le cas des neurones de la rétine (von Gersdorff and Matthews, 1994).

De nombreux débats portant sur la fusion persistent. Le premier concerne le rôle exact de la synaptotagmine en tant que senseur du calcium et élément déclencheur de la fusion. Un autre débat porte sur les différents types de fusion et leur raison d'être: fusion partielle ou totale. Enfin, la nature du pore de fusion est elle aussi sujette à controverse : plutôt lipidique ou mixte? Je vais tenter de présenter ici brièvement quelques données concernant chacun de ces points ainsi que les hypothèses proposées.

i) Les synaptotagmines

L'élément déclencheur de l'exocytose étant l'augmentation de calcium intracellulaire, la machinerie moléculaire doit disposer d'un senseur de calcium. Les candidats fortement proposés pour ce rôle-là appartiennent à la famille des synaptotagmines, composée d'une dizaine de membres. Ces protéines se trouvent sur les membranes de très nombreux compartiments cellulaires, comme les lysosomes, la membrane plasmique ou les granules de sécrétion. Les synaptotagmines possèdent deux domaines C2 (C2A et C2B) pouvant lier les lipides et le calcium, mais elles peuvent également interagir avec le complexe SNARE, les canaux calciques, la calmoduline, la protéine adaptatrice de la clathrine (AP2) (Marqueze *et al.*, 2000). De par ces nombreuses interactions, les synaptotagmines permettent de mettre en

place une sorte de plate-forme fonctionnelle regroupant les acteurs indispensables au bon déroulement de l'exocytose voire de l'endocytose.

Pendant plusieurs années, Wang et collaborateurs ont travaillé sur le rôle de la synaptotagmine I. Au final, ils ont réussi à démontrer que celle-ci est impliquée dans la stabilisation et l'ouverture du pore de fusion, et qu'avec la synaptotagmine IV, elles favorisent les phénomènes de fusion totale ou partielle, respectivement (Wang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003a; Wang *et al.*, 2006). La synaptotagmine IV n'est pas limitée à un seul rôle puisqu'elle serait aussi impliquée dans la maturation des granules de sécrétion (Ahras *et al.*, 2006). Enfin, la synaptotagmine VII a un profil relativement intéressant du fait de sa localisation sur de très nombreux types de vésicules et son rôle dans divers types de phénomènes d'exocytose. En effet, elle est impliquée dans l'exocytose des lysosomes et la restriction de l'expansion du pore de fusion (Jaiswal *et al.*, 2004). De plus, elle participe à la sécrétion de l'insuline dans les cellules β du pancréas (Gut *et al.*, 2001). Il semblerait que la démonstration formelle de l'implication d'une synaptotagmine particulière n'ait pas été faite pour l'instant, et plusieurs éléments contribuent à la complexité du sujet. Ces protéines peuvent s'associer et former des hétéro-oligomères, ce qui augmente les interactions et complique l'interprétation des résultats. De plus, les domaines C2A et C2B n'ont pas la même affinité pour le calcium, et ces affinités peuvent varier en fonction de divers facteurs. Tous ces éléments rendent la compréhension exacte du mode d'action de la (des) synaptotagmine(s) encore plus difficile, mais pour l'instant la fonction de senseur calcique leur est toujours attribué.

ii) Fusion totale versus fusion partielle

Le phénomène de fusion n'est pas aussi simple qu'il n'y paraît. En effet, le granule peut fusionner de deux façons différentes. Le premier mode de fusion est partiel et il intervient dans les phénomènes de kiss-and-run. Le kiss-and-run correspond à une ouverture/fermeture dynamique du pore de fusion. Il semblerait que, de ce fait, il n'y ait qu'une libération partielle du contenu granulaire. Toutefois, l'existence de ce processus est très controversée dans les neurones (Harata *et al.*, 2006a). Le deuxième mode est plus lent, et la membrane vésiculaire fusionne totalement avec la membrane plasmique: c'est la fusion complète. Dans les cellules chromaffines, Elhamdani et collaborateurs (2006) ont démontré par l'intermédiaire de mesure de capacitance que plus la fréquence de stimulation est importante, plus le taux de fusion totale augmente. Afin de visualiser les différents modes d'exocytose par imagerie, Harata et collaborateurs ont mis au point une technique qui leur a permis d'étudier la proportion de kiss-and-run dans les neurones de l'hippocampe (Harata *et al.*, 2006b). En effet, ils utilisent le fait

que lors de la fusion, l'espace intra-granulaire devient accessible à un composé se trouvant dans le milieu extra-cellulaire. En mettant dans ce milieu le bleu de bromophénol, qui a une taille lui permettant de pénétrer dans un granule n'ayant effectué qu'une fusion partielle, il est possible de voir les vésicules qui ont effectué un kiss-and-run. De cette façon, les auteurs ont pu mettre en évidence que toutes les vésicules peuvent faire du kiss-and-run mais que celui-ci est majoritairement observé pour des stimulations faibles (80% à 0,3 Hz contre 50% à 30 Hz). Il semble donc que les deux types d'exocytoses co-existent dans les cellules nerveuses ou endocrines, ce qui semblerait logique puisqu'elles ne permettent pas de libérer les mêmes composés. En effet, le kiss-and-run ouvre un pore de petite taille ne laissant passer que les catécholamines et les petites molécules. Quant aux autres peptides contenus dans le granule de sécrétion, ils pourront être libérés lors de la fusion totale (Fulop *et al.*, 2005). Cela semble cohérent au niveau physiologique, puisqu'une stimulation forte correspondrait à un niveau de stress élevé qui nécessiterait la mise en jeu de mécanismes supplémentaires stimulés par une quantité de catécholamines plus importante et la libération des autres composants de la matrice granulaire, le tout pour que l'organisme puisse faire face à l'élément ayant suscité ledit stress (figure 13).

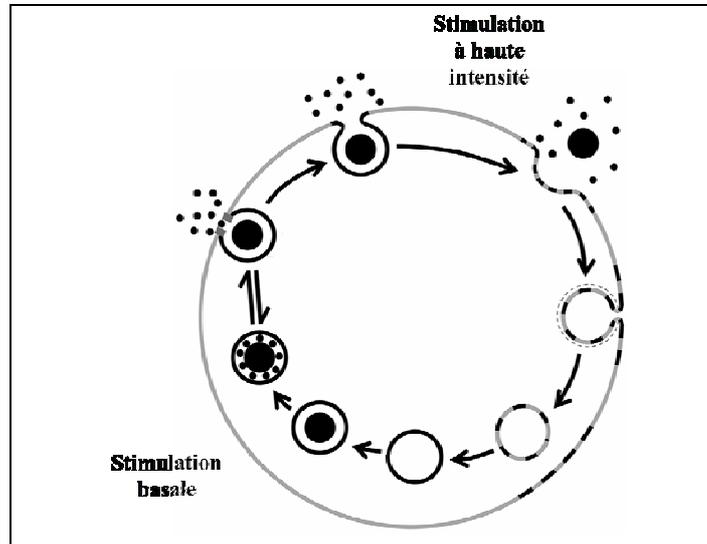


Figure 13: Modèle présentant les différents modes d'exocytose en fonction du type de stimulation.

A la suite d'une stimulation basale, la membrane granulaire ne fusionne pas complètement avec la membrane plasmique. De ce fait, seules les molécules les plus petites seront libérées. En revanche, lors d'une stimulation à forte intensité, la fusion des membranes granulaire et plasmique est plus complète, permettant ainsi l'exocytose des grosses molécules. (Fulop *et al.*, 2005)

iii) Nature du pore de fusion

La nature du pore de fusion est elle aussi sujet à controverse, avec deux hypothèses: nature lipidique ou protéo-lipidique?

Les lipides ont un rôle primordial dans la fusion car les membranes subissent des variations de courbure importantes. Les enzymes responsables de la synthèse de lipides comme la phospholipase D (qui transforme la phosphatidylcholine en acide phosphatidique) ont un rôle démontré au cours de l'exocytose régulée dans les cellules chromaffines (Vitale *et al.*, 2001). En effet, l'apport de certains lipides modifiant les courbures membranaires peut favoriser les phénomènes de fusion. Les équipes de Mayer et de Cohen ont soutenu l'hypothèse du pore lipidique au cours d'une réaction de fusion dépendante des SNARE en utilisant les vacuoles chez la levure (Reese *et al.*, 2005) ou les fusions induites par l'hémagglutinine du virus de la grippe (Razinkov *et al.*, 1999; Markosyan *et al.*, 2000) (figure 14). Paradoxalement, Mayer avait travaillé les années précédentes sur la nature protéo-lipidique du pore de fusion en utilisant la sous-unité Vo de la V_{ATPase} chez la levure; il avait montré à quel point ce "tube" formé par cette sous-unité était important pour la fusion au cours de la fusion des vacuoles (Peters *et al.*, 2001; Bayer *et al.*, 2003).

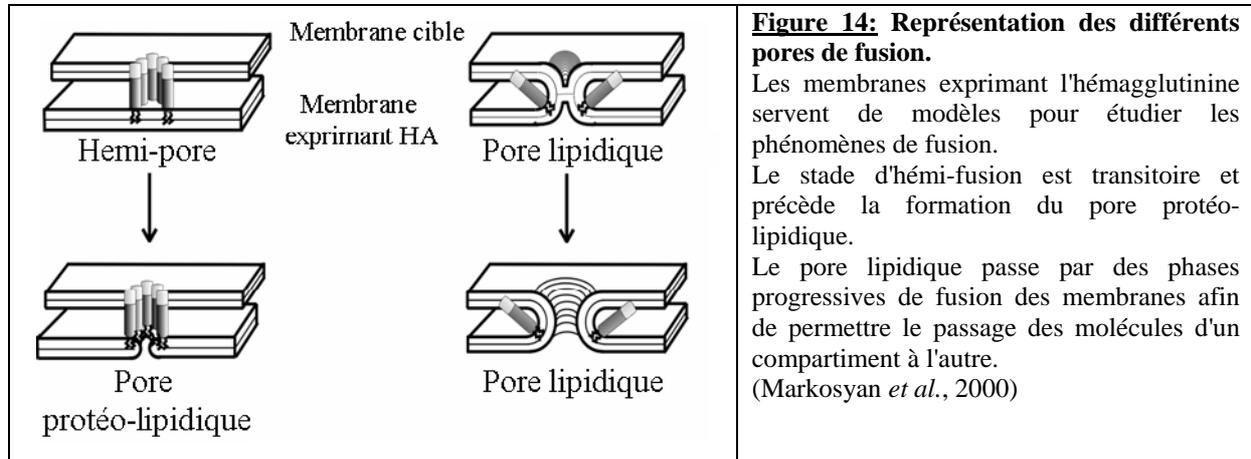


Figure 14: Représentation des différents pores de fusion.

Les membranes exprimant l'hémagglutinine servent de modèles pour étudier les phénomènes de fusion.

Le stade d'hémi-fusion est transitoire et précède la formation du pore protéo-lipidique.

Le pore lipidique passe par des phases progressives de fusion des membranes afin de permettre le passage des molécules d'un compartiment à l'autre.

(Markosyan *et al.*, 2000)

Dans leur revue, Meyer Jackson et Edwin Chapman (2006) présentent les deux hypothèses concernant le pore de fusion, à savoir le pore protéo-lipidique et le pore lipidique, et ils y décrivent les protéines responsables de la structure du pore protéo-lipidique comme étant les SNARE (voir figure 15).

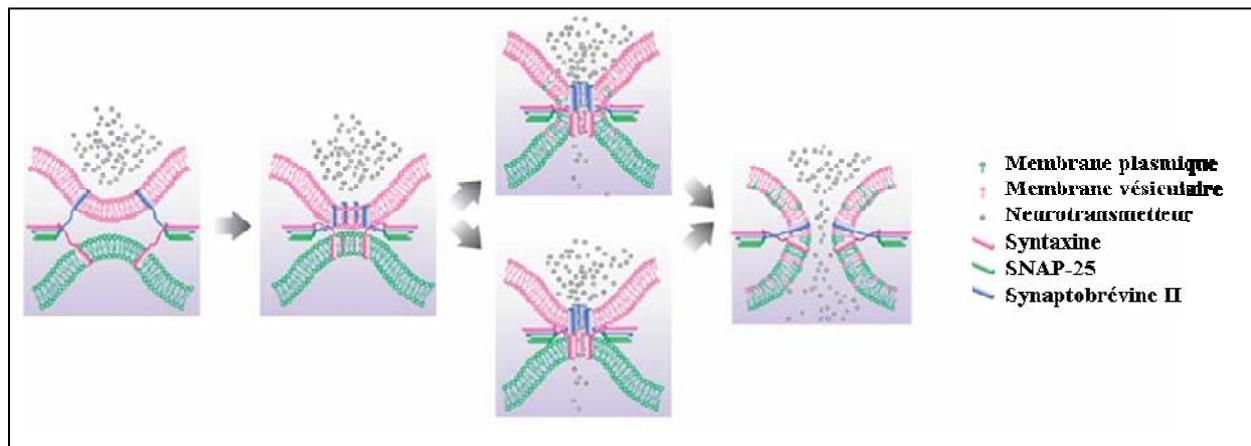


Figure 15: Modèle schématique du pore de fusion protéo-lipidique

Le schéma ci-dessus présente les différentes étapes de formation du pore de fusion protéo-lipidique. Cela met en jeu les protéines SNARE, qui seraient responsables de la structure en hémi-canal du pore. Si chaque hémi-canal est composé de sous-unités protéiques séparées, il faudrait une synchronisation entre la séparation latérale de ces sous-unités et l'incorporation de lipides entre elles pour initier l'expansion du pore. D'après (Jackson and Chapman, 2006).

IV-3-e. Endocytose et/ou recyclage

Les granules ont enfin pu libérer leur contenu dans le milieu extra-cellulaire. Mais que deviennent-ils une fois l'exocytose terminée ? Il est évident que la membrane des granules et vésicules doit être récupérée après la fusion. Bittner et Kennedy en ont eu la certitude dès 1970 en travaillant sur la jonction neuromusculaire de langouste. Avec une stimulation de 20 Hz, ils ont calculé que si chaque vésicule synaptique fusionnait complètement avec la membrane présynaptique, l'ajout de membrane correspondrait à une croissance de 77 à 154 cm de longueur d'axone par heure: une catastrophe pour l'organisme. Le phénomène d'endocytose compensatrice est absolument indispensable à l'intégrité des cellules sécrétrices, nerveuses ou pas (Galli and Haucke, 2004). Bien que l'hypothèse de la récupération des membranes vésiculaires ait germé très tôt, les mécanismes moléculaires gouvernant ce processus sont peu connus et les données restent controversées depuis plus de trente ans (Ceccarelli *et al.*, 1973; Heuser and Reese, 1973).

Dans les cellules neuroendocrines, des études morphologiques ont montré que la membrane plasmique ne présente pas de marqueur vésiculaire, ce qui suggère que ces derniers sont récupérés sélectivement *via* l'endocytose (Patzak *et al.*, 1984). Tsuboi et collaborateurs ont démontré que la recapture des granules de sécrétion se fait directement depuis leur site d'exocytose (Tsuboi *et al.*, 2002), concluant ainsi à un couplage spatial entre exocytose et endocytose. Les résultats de l'équipe d'Artalejo dans les cellules chromaffines démontrent qu'à chaque type d'exocytose se trouve associé un mode d'endocytose, à savoir qu'une fusion

incomplète de type kiss-and-run est suivie d'une endocytose rapide dépendant de la dynamine-1 alors que la fusion complète est suivie d'une endocytose plus lente nécessitant la clathrine et la dynamine-2 (Artalejo *et al.*, 1995; Artalejo *et al.*, 2002; Elhamdani *et al.*, 2006). Dans le cas du kiss-and-run, le granule garde sa forme initiale, ce qui peut expliquer une endocytose plutôt brève. La fusion totale implique une endocytose plus complexe dans la mesure où le granule fusionne complètement avec la membrane plasmique. Ce processus est plus long, d'une part, et d'autre part, il met en jeu des mécanismes moléculaires spécifiques tels que le recouvrement de la vésicule par la clathrine. L'endocytose utilisant la clathrine n'est pas seulement connu dans les cellules sécrétrices mais elle est le moyen utilisé pour recycler les composants de la membrane plasmique et internaliser des récepteurs (voir figure 16).

La membrane plasmique va s'invaginer, suite à la formation d'un "manteau" protéique composé de la clathrine (sous forme de triskélions) et de la protéine adaptatrice AP-2. Une étape importante au cours de l'endocytose est la séparation de la membrane plasmique et de la vésicule recouverte de clathrine. Elle se fait *via* l'intervention d'une GTPase particulière, la dynamine, qui peut former une structure s'enroulant autour du "cou" entre le granule endocytosé et la membrane plasmique. Grâce à un effet de constriction, elle permet la séparation ou fission. Les principaux intervenants sont connus, d'autres sont soupçonnés (action de l'actine au moment de la fission, PIP2) (Perrais and Merrifield, 2005).

Une fois l'endocytose effectuée, les vésicules synaptiques sont ré-acidifiées puis remplies de neurotransmetteur grâce au gradient de protons, et elles sont prêtes pour effectuer un nouveau cycle de sécrétion. Les travaux d'Ashton en 2005 ont démontré que le RRP pouvait se recycler totalement et se recharger en neurotransmetteur indépendamment des vésicules de réserve, et ce en moins de 30s (Ashton and Ushkaryov, 2005).

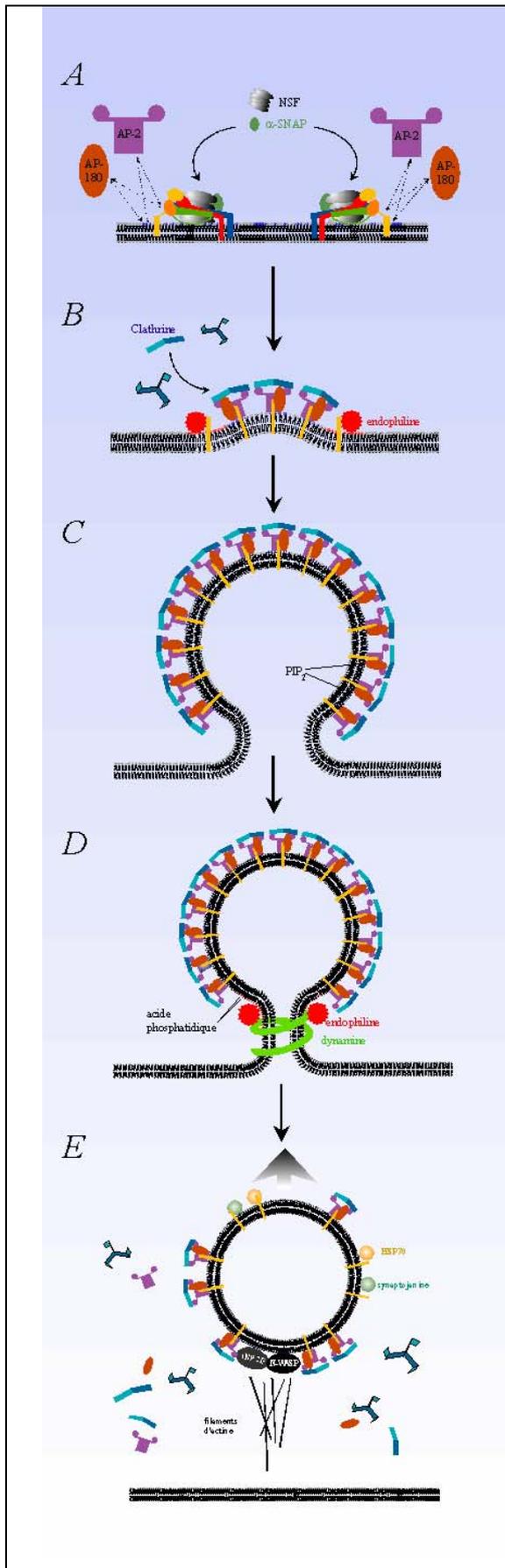


Figure 16: Etapes de l'endocytose dépendante de la clathrine.

Etape 1: préparation à la formation de la vésicule d'endocytose. Les complexes SNARE sont ouverts par action du NSF et de α -SNAP. La présence conjointe de synaptotagmine et phosphoinositides permet l'arrimage des complexes AP-2 et AP-180.

Etape 2: l'assemblage de complexes AP-2/AP-180 permet le recrutement des triskelions de clathrine et l'amorçage de la courbure membranaire. L'endophiline semble importante pour générer la courbure à ce niveau (Ringstad *et al.*, 1999).

Etape 3: il y a formation d'une vésicule recouverte d'un manteau de clathrine de diamètre constant. L'endocytose peut être arrêtée à ce niveau en introduisant le domaine SH3 de l'amphiphysine (Shupliakov *et al.*, 1997). Ceci suggère un rôle important de l'amphiphysine dans le recrutement de la dynamine qui intervient dans la fission (voir ci-dessous).

Etape 4: la constriction et la fission requièrent l'action de la dynamine, ainsi que celle de l'endophiline. D'autres protéines à domaines SH3 (amphiphysine et intersectine) sont aussi importantes, puisque leur inactivation entraîne l'accumulation de vésicules d'endocytose à ce stade.

Etape 5: la perte de l'enveloppe de clathrine à lieu dès la fission car peu de vésicules d'endocytose recouvertes de clathrine sont trouvées libres dans le cytosol. La synaptojanine est recrutée par l'endophiline, et participe à la réaction en coopération avec hsc70 et l'auxiline (non montrée) (Perrais and Merrifield, 2005).

Daprès Humeau 2002.

Deuxième partie:

Régulation de la dynamique de l'actine au cours de l'exocytose: un rôle pour Cdc42

I. Le cytosquelette d'actine

I-1. Généralités

Avec les microtubules et les filaments intermédiaires, l'actine est un des éléments composant le cytosquelette. Elle est présente sous deux formes dans toutes les cellules eucaryotes : l'actine globulaire (actine G), protéine d'environ 43 kDa, qui peut polymériser afin de former l'actine filamenteuse (actine F) et dépolymériser selon les besoins de la cellule.

L'actine G a la propriété de lier des nucléotides (ATP ou ADP) ainsi que certains cations tels que les ions calcium, potassium et magnésium. La structure spatiale de l'actine G montre une cavité centrale correspondant au site de fixation des nucléotides et de l'ion divalent. Les ions Ca^{2+} ou Mg^{2+} liés à ce site interagissent avec les phosphates β et γ de l'ATP. La stabilité du complexe actine G-ATP-ion est assurée par la formation de liaisons hydrogènes et de ponts salins entre certains résidus et les phosphates de l'ATP ou l'ion divalent (Kabsch and Holmes, 1995).

Le processus de polymérisation de l'actine se déroule en trois étapes (Carlier, 1991) et sont représentées dans la figure 17:

i- la fixation d'ions divalents induit un changement de conformation de l'actine G ; cela permet l'activation des complexes actine G-ATP-ion, les rendant compétents pour interagir entre eux.

ii- la nucléation est l'étape permettant à trois monomères d'actine activés de s'assembler. Ce trimère, ou noyau de polymérisation, est la structure minimale nécessaire à l'élongation d'un filament.

iii- l'élongation correspond à l'ajout de monomères d'actine sur les noyaux de polymérisation.

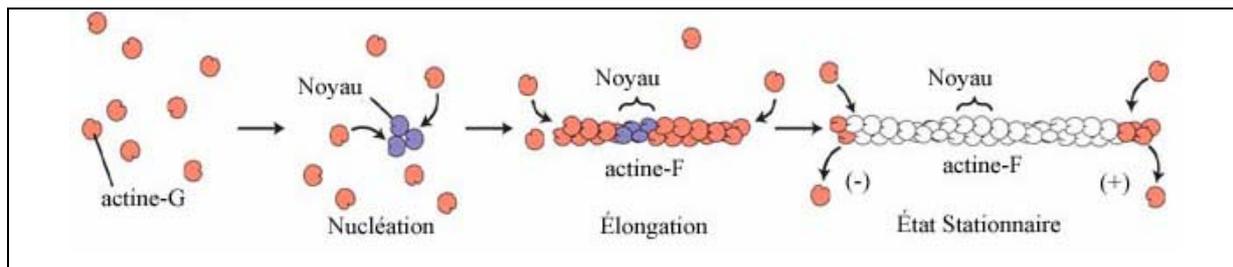


Figure 17: Processus de polymérisation de l'actine.

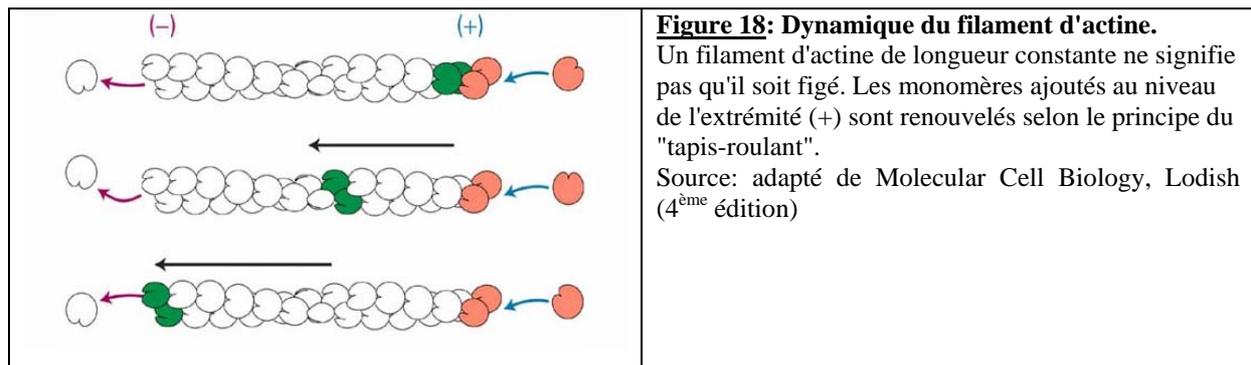
Au cours de la nucléation, il y a assemblage d'un noyau de trois monomères d'actine qui formeront la structure de départ nécessaire à l'élongation d'un nouveau filament. L'état stationnaire correspond à l'équilibre dynamique du filament.

Source: adapté de Molecular Cell Biology, Lodish (4^{ème} édition)

Le filament d'actine est en équilibre permanent entre la polymérisation et la dépolymérisation, et ces deux événements ne se produisent pas de façon égale à chaque extrémité du filament : l'extrémité B (pour barbed end) nommée également extrémité (+) favorisera l'assemblage des monomères, alors que l'extrémité P (pour pointed end), ou extrémité (-), favorisera plutôt leur dissociation. L'élongation peut être régulée par deux facteurs : la concentration critique en actine G et l'hydrolyse de l'ATP.

L'élongation se poursuit à chaque extrémité jusqu'à ce que la concentration en actine G atteigne une « concentration critique » en dessous de laquelle l'incorporation aux filaments est impossible, et chaque extrémité est régulée par une concentration critique différente (Wegner and Isenberg, 1983). La concentration critique inhibant l'élongation à l'extrémité B étant plus faible (0,5 μM) que celle de l'extrémité P (1,5 μM), l'extrémité B favorisera donc l'incorporation de monomères.

Le monomère d'actine hydrolyse son ATP dès son incorporation dans le filament (Carlier *et al.*, 1987) et libère un phosphate inorganique (Pi) dans le milieu cellulaire. Le long du filament, chaque monomère passera par trois états différents : l'actine-ATP, fixée à l'extrémité B, l'actine-ADP-Pi (forme transitoire) et l'actine-ADP qui s'accumule à l'extrémité P avant d'être dissociée du filament. A l'équilibre, la dissociation à l'extrémité P est compensée par l'ajout de monomères à l'extrémité B. Grâce à cet équilibre dynamique (ou pseudo état stationnaire), la longueur du filament d'actine ne varie pas alors l'actine se déplace d'une extrémité à l'autre : c'est le processus du « tapis-roulant », schématisé dans la figure 18.



I-2. Régulation

Sachant à quel point l'existence d'un filament d'actine est précaire, la cellule possède de nombreux moyens de réguler et d'adapter la quantité de filaments dont elle a besoin. En effet, ces filaments se présentent sous différentes formes selon leur fonction : on peut les trouver des filaments courts, des faisceaux de filaments parallèles ou un réseau dense de filaments interconnectés. Cette diversité dans l'organisation de l'actine suppose une grande variété dans les molécules régulant sa dynamique. Globalement, on peut diviser en deux groupes ces molécules selon leur mode d'action (Winder and Ayscough, 2005)

- les protéines modulant la dynamique des filaments d'actine : ces protéines peuvent favoriser la polymérisation ou la dépolymérisation des filaments. Elles peuvent le faire en séquestrant les monomères d'actine, en se liant à une extrémité ou à une autre (et donc en déplaçant l'équilibre de cette extrémité) ou encore en fragmentant un filament déjà existant.
- les protéines de stabilisation et de réticulation de l'actine. Certaines protéines vont stabiliser les filaments en empêchant la dépolymérisation. Les protéines de réticulation, quant à elle, vont permettre d'associer des filaments entre eux afin de former des réseaux ou de les ancrer aux membranes.

La figure 19 illustre de manière non exhaustive la diversité des protéines capables de réguler la dynamique de l'actine.

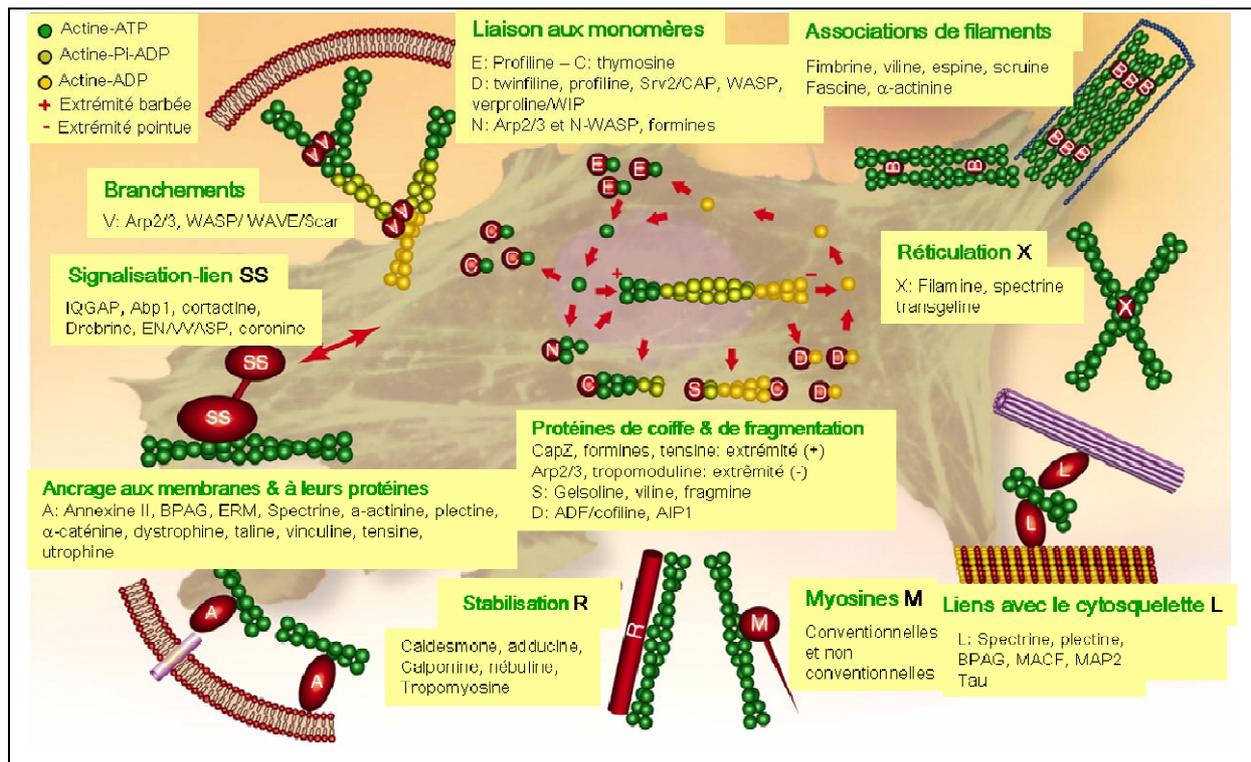


Figure 19: Ensemble des protéines interagissant avec l'actine.
(Winder and Ayscough, 2005)

Du fait de l'instabilité des monomères et dimères d'actine, la synthèse de filaments à partir d'actine G ne peut se faire spontanément ; toutefois, dès lors qu'un trimère est formé, l'élongation peut se poursuivre rapidement. Afin de contrôler les rapports des populations d'actine F et G, la cellule a mis en place différents mécanismes de régulation. Le premier consiste en la régulation de la croissance par des protéines dites "de coiffe" qui se fixent sur l'extrémité B et limitent ainsi la croissance du filament (capping proteins). Un autre mode de régulation est celui passant par les protéines pouvant couper et ainsi fragmenter les filaments. Il existe aussi des protéines permettant l'association et la stabilisation des filaments. Enfin, il peut y avoir la production *de novo* de filaments d'actine. Cette néo-synthèse nécessite l'intervention de protéines pouvant accélérer la nucléation des monomères et stabiliser les noyaux de polymérisation néoformés. Parmi les molécules responsables de la polymérisation de nouveaux filaments d'actine se trouvent le complexe Arp2/3 et les protéines de la famille WASP/N-WASP. Etant donné que N-WASP et Arp2/3 font partie de la cascade moléculaire que nous avons mise en évidence dans le processus d'exocytose (voir publication 1), j'ai choisi de détailler plus particulièrement ces deux familles de protéines.

I-2-a. Le complexe Arp2/3

L'activité de polymérisation de l'actine par WASP et N-WASP est étroitement liée à la présence du complexe Arp2/3 et à sa fonction de nucléation. Ce complexe est composé de sept protéines au total, assemblée avec une stoechiométrie de 1:1 pour chacune. Les protéines Arp2 et Arp3 ont une structure proche de celle d'un monomère d'actine (Actin Related Protein) à 40-50% et 30-40% d'identité de séquence respectivement (Mullins *et al.*, 1997). De nombreuses appellations ont été données aux cinq autres protéines constituant ce complexe ; selon la nomenclature du génome humain en vigueur, les noms sont ARPC1 (pour p41-Arc), ARPC2 (p34-Arc), ARPC3 (p21-Arc), ARPC4 (p20-Arc) et ARPC5 (p16-Arc), et les caractéristiques plus détaillées et complètes de ces protéines sont décrites dans la revue de Poch et Winsor (1997). Ce complexe protéique est retrouvé dans tous les types cellulaires et dans de très nombreuses espèces, autant animales que végétales.

Les études menées chez *Saccharomyces cerevisiae* ont montré que Arp2/3 était nécessaire à la mobilité et à l'intégrité des patches d'actine (Winter *et al.*, 1997), et qu'il est aussi capable d'interagir avec Las17p/Bee1p, l'homologue de WASP chez la levure (Madania *et al.*, 1999). L'importance de ce complexe a aussi été mise en évidence par Welch *et al.* qui ont montré qu'il était suffisant pour former la queue d'actine et générer la motilité du pathogène *Listeria monocytogenes* (Welch *et al.*, 1997). La présence du complexe Arp2/3 dans son intégralité semble être cruciale pour la survie cellulaire et son organisation. En effet, des expériences d'inactivation génique ont montré une létalité dans la quasi-totalité des espèces sur lesquelles les expériences ont été faites, tant chez la levure *S. pombe* (Balasubramanian *et al.*, 1996), l'amibe *D. discoideum* (Insall *et al.*, 2001) que dans les cellules humaines (Harborth *et al.*, 2001).

Il a été observé que le complexe Arp2/3 peut lier les filaments d'actine et à partir de là amorcer la nucléation des monomères entre eux (Amann and Pollard, 2001; Volkman *et al.*, 2001), permettant ainsi l'élongation de nouveaux filaments formant un angle de 70° avec le filament d'origine (figure 20a). Cette fonction explique l'observation en microscopie électronique du réseau d'actine présentant une organisation sous forme de branches aussi nommées "réseau dendritique" (figure 20b).

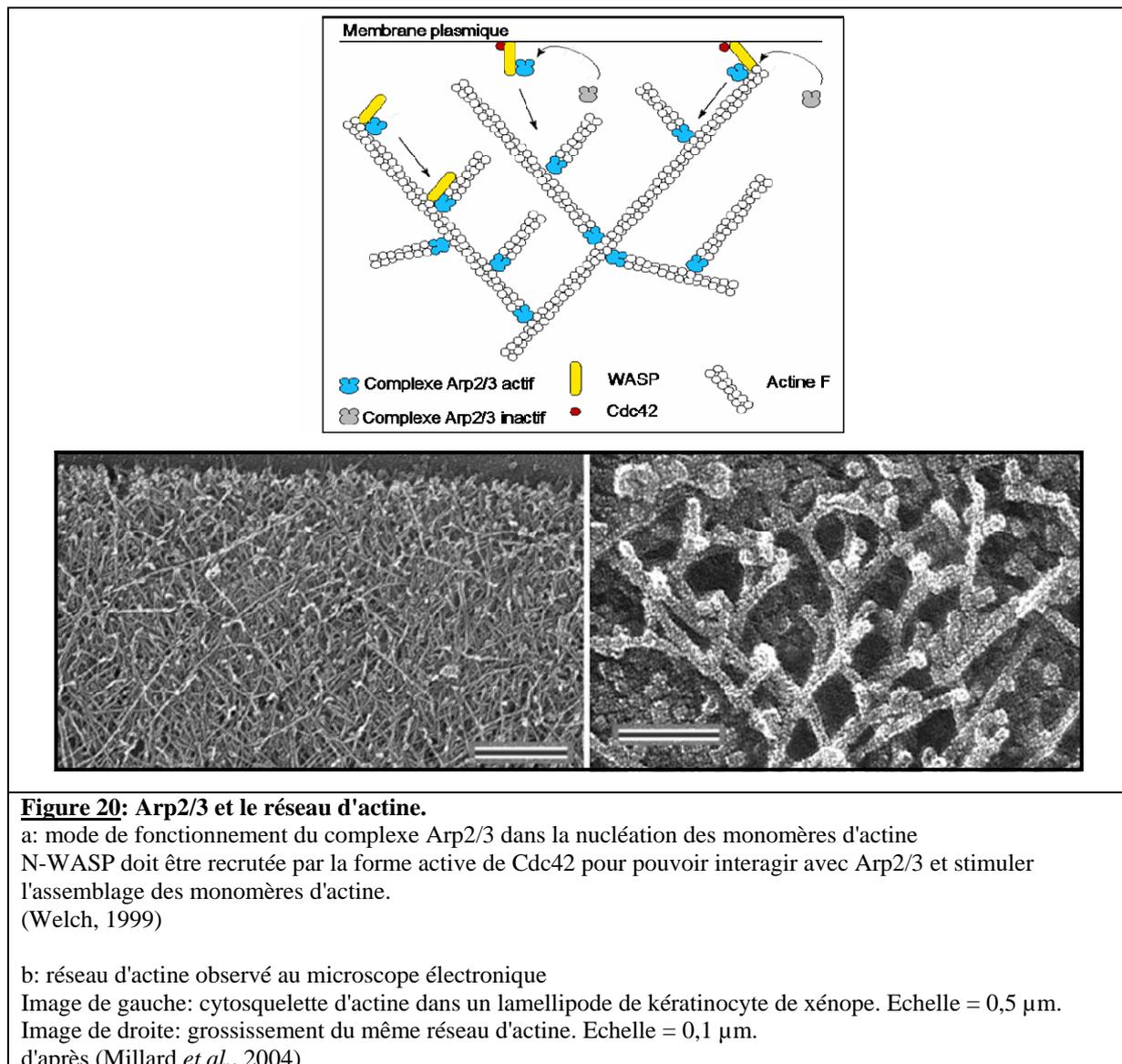


Figure 20: Arp2/3 et le réseau d'actine.

a: mode de fonctionnement du complexe Arp2/3 dans la nucléation des monomères d'actine
 N-WASP doit être recrutée par la forme active de Cdc42 pour pouvoir interagir avec Arp2/3 et stimuler l'assemblage des monomères d'actine.
 (Welch, 1999)

b: réseau d'actine observé au microscope électronique
 Image de gauche: cytosquelette d'actine dans un lamellipode de kératinocyte de xénope. Echelle = 0,5 μm.
 Image de droite: grossissement du même réseau d'actine. Echelle = 0,1 μm.
 d'après (Millard *et al.*, 2004)

L'activité du complexe Arp2/3 peut être régulée par plusieurs facteurs. Par exemple, les protéines de coiffe sont en compétition avec Arp2/3 et réduisent donc sa capacité à promouvoir la nucléation de l'actine (Falet *et al.*, 2002). L'hydrolyse d'ATP par Arp2/3 est essentielle à l'activité de nucléation du complexe (Dayel *et al.*, 2001). Toutefois, certaines études récentes chez la levure tendraient à montrer que l'ATP serait responsable du détachement des filaments (Kovar, 2006). D'autres activateurs de Arp2/3 sont connus, comme ActA, une protéine bactérienne utilisée par *Listeria monocytogenes*, la myosine I, dont on retrouve différents homologues chez les champignons et chez la levure ou encore la cortactine, qui a la capacité de stabiliser les filaments néo-synthétisés par Arp2/3 (Weaver *et al.*, 2001; Millard *et al.*, 2004). Les activateurs les plus importants et les mieux connus sont les protéines de la famille WASP, détaillée dans le chapitre précédent.

Ces protéines régulant la dynamique de l'actine sont contrôlées en amont par d'autres molécules. Les GTPases monomériques de la famille Rho font partie de ces mécanismes de contrôle, et elles sont aussi impliquées dans l'exocytose et de nombreux processus de trafic. Pour cette raison je les traiterai de façon un peu plus approfondie dans le chapitre suivant.

I-2-b. La famille WASP et Scar/WAVE

WASP (pour Wiskott-Aldrich Syndrome Protein), le premier membre de cette famille de protéines, a été identifié comme la protéine résultant de l'expression d'un gène muté chez les patients atteints du syndrome de Wiskott-Aldrich, une maladie génétique liée au chromosome X. Les patients souffrant de ce syndrome présentent des problèmes immunitaires et de coagulation dus à un défaut du cytosquelette d'actine dans les globules blancs et les plaquettes (Imai *et al.*, 2003). La protéine WASP est exclusivement exprimée dans les cellules hématopoïétiques. Les autres types cellulaires possèdent l'isoforme N-WASP à l'origine isolée à partir de cerveau de rat et dont l'homologue est Bee1/Las17 chez la levure (Li, 1997), ainsi que WAVE (WASP Verprolin homologous protein), un homologue (Miki *et al.*, 1998) aussi nommé Scar chez *Dictyostelium discoideum* (Bear *et al.*, 1998). Ces protéines appartiennent aux nombreuses cascades de signalisation responsables de la formation de filipodes, lamellipodes, et autres structures à base d'actine impliquées dans la mobilité cellulaire. Au cours de ce chapitre je me focaliserai sur les protéines WASP et N-WASP.

i) Structure

Les protéines WASP et N-WASP ont un poids moléculaire d'environ 65 kDa. Elles présentent une organisation très similaire, avec un domaine C-terminal conservé, et une région N-terminale plus diversifiée qui régule l'activité de la partie C-terminale (figure 21).

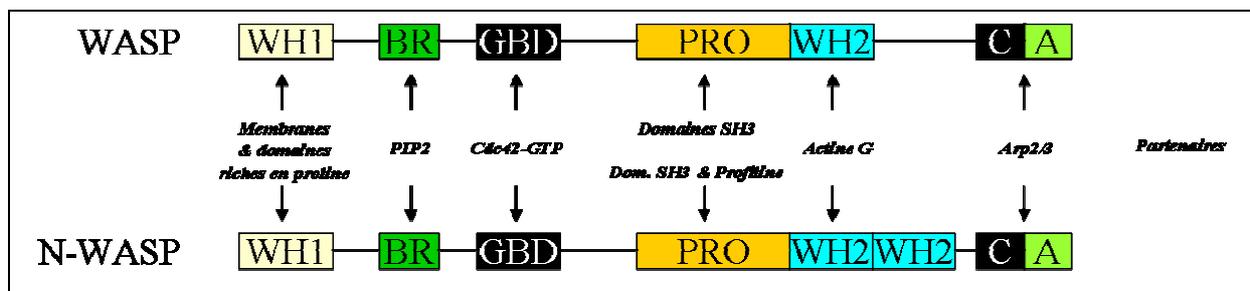


Figure 21: Représentation schématique des protéines de la famille WASP-Scar.
 WH1: WASP Homology 1, BR: domaine basique, GBD: domaine de liaison aux GTPases, PRO: domaine riche en proline, WH2: WASP Homology 2, C: région central, A: domaine acide
 (Caron, 2002)

En effet, c'est en C-terminal que se trouvent les domaines capables de lier les monomères d'actine et de les mettre en contact avec le complexe Arp 2/3, connu pour promouvoir la nucléation de l'actine. Ces domaines constituent le module VCA composé d'un domaine V (aussi appelé WH2 pour WASP Homology 2) qui peut lier l'actine G, du domaine C (cofilin homology domain) et enfin d'une région C-terminale A sur laquelle se fixe le complexe Arp2/3. Les domaines C et V agissent en synergie afin de permettre les changements conformationnels d'Arp2/3 nécessaires à la nucléation (Panchal *et al.*, 2003).

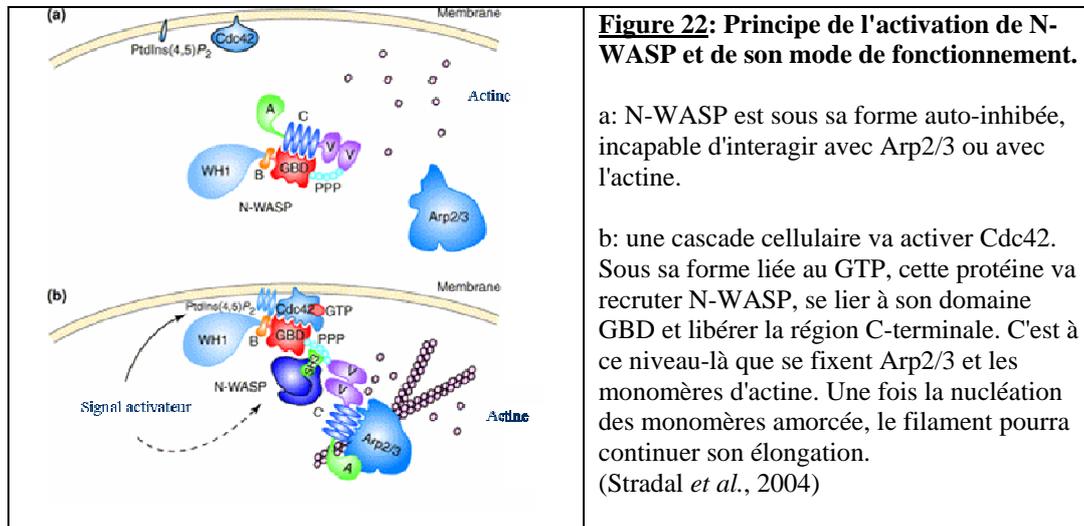
Les régions N-terminales de WASP et N-WASP présentent une organisation en domaines relativement similaire. En effet, elles possèdent toutes deux un domaine WH1 (WASP Homology 1), une région basique et un domaine CRIB (Cdc42 and Rac Interactive Binding domain) aussi nommé GBD pour "GTPase Binding Domain". Le domaine WH1 est fonctionnellement important car c'est à ce niveau que se trouvent les mutations responsables du syndrome de Wiskott-Aldrich (Imai *et al.*, 2003); il peut aussi se lier à l'actine filamenteuse (Egile *et al.*, 1999). Le domaine BR est capable de lier le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2). Enfin, le domaine CRIB peut interagir avec Cdc42 (Higgs and Pollard, 2000; Rohatgi *et al.*, 2000).

ii) Régulation

Grâce à leur domaine WH1, N-WASP et WASP peuvent lier la protéine WIP (Wiskott-Aldrich Interacting Protein), indispensable à leur activation (Anton and Jones, 2006). Toutefois, d'autres molécules sont nécessaires à cette activation. En effet, WASP et N-WASP se trouvent sous une forme auto-inhibée due à des liaisons entre les domaines VCA et CRIB. Suite à la fixation de la forme activée de Cdc42 au domaine CRIB, l'inhibition est levée et les domaines situés en C-terminal peuvent lier l'actine G, le complexe Arp2/3 et promouvoir la formation de microfilaments (figure 22). L'action concomitante du PIP2 et de Cdc42 est nécessaire et se fait de manière coopérative (Higgs and Pollard, 2000; Rohatgi *et al.*, 2000). Le rôle du PIP2 dans le contexte exo-endocytose sera évoqué dans la discussion générale.

In vivo, il semblerait que N-WASP et Arp2/3 ne soient pas suffisant pour que la voie activée par Cdc42 permette la polymérisation d'actine dans un contexte physiologique. En effet, à partir d'extraits d'œufs de xénope, Ho et collaborateurs ont montré que l'intervention d'un facteur supplémentaire, Toca-1, est nécessaire à l'activation de N-WASP par Cdc42 (Ho

et al., 2004). Toca-1 pourrait agir directement sur l'activation de N-WASP en coopérant avec Cdc42 ou indirectement en levant l'inhibition médiée par l'interaction de WIP avec N-WASP.



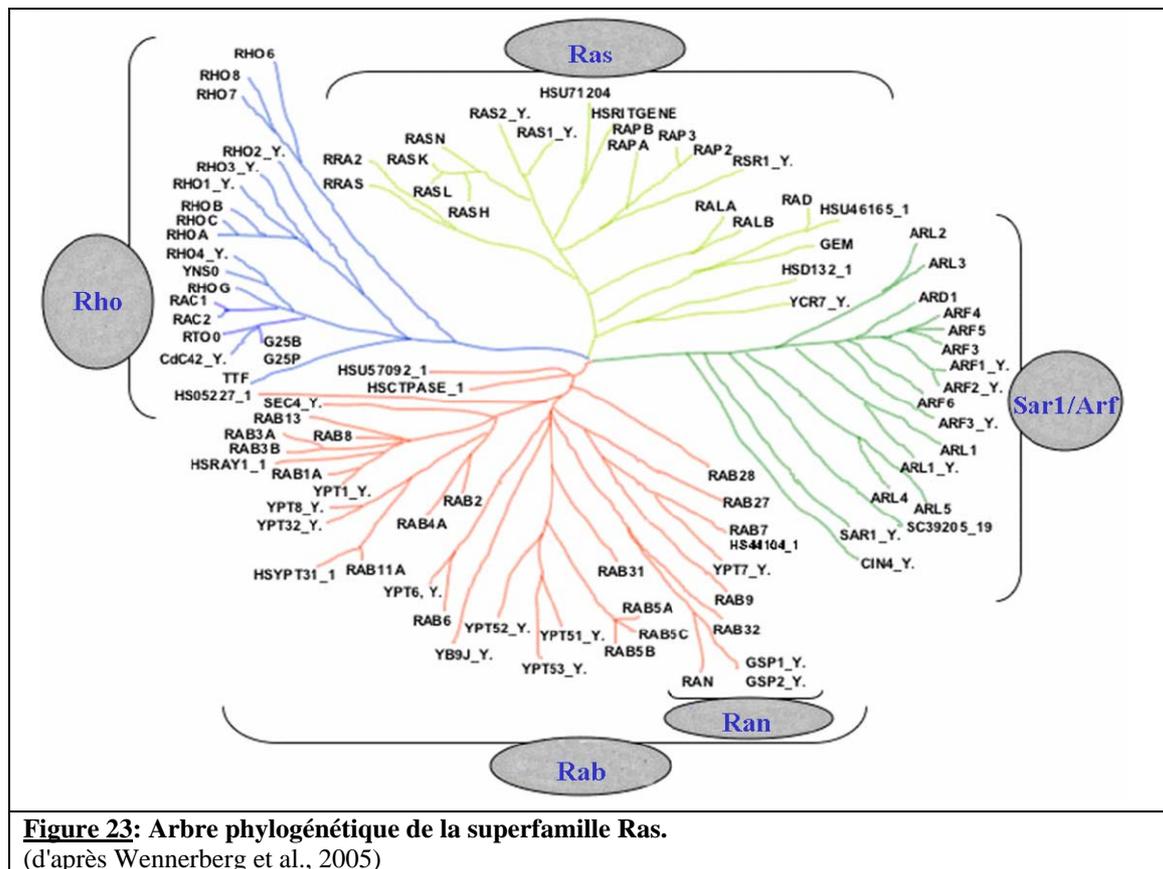
L'activation de N-WASP peut également être régulée par la phosphorylation. En effet, il a été montré *in vitro* que la tyrosine 291, située près du domaine CRIB, est un substrat pour les kinases des familles Abl, Btk et Src. Cette modification a pour effet d'augmenter l'activité basale de WASP (Cory *et al.*, 2003; Torres and Rosen, 2003). Toutefois, cette phosphorylation ne peut avoir lieu que si Cdc42 est liée au domaine CRIB et qu'elle active WASP (Guinamard *et al.*, 1998; Torres and Rosen, 2003). Les auteurs proposent un modèle où WASP serait activée par Cdc42, permettant ainsi la phosphorylation de la tyrosine 291. Une fois WASP activée, Cdc42 s'en détache mais la phosphorylation persistera, permettant ainsi à WASP de conserver son activité même en absence de stimulus. Ce cas d'activation par phosphorylation sur une tyrosine équivalente a été démontré chez N-WASP; il semblerait que les tyrosines-kinases de la famille Src soient impliquées *in vivo*, et la phosphorylation ajoutée aurait pour rôle dans un premier temps d'activer N-WASP puis d'en initier la dégradation par le protéasome (Suetsugu *et al.*, 2002). L'activité des protéines WASP et N-WASP peut aussi être régulée via une interaction avec des protéines possédant des domaines SH3 (Src-Homology 3) (Takenawa and Miki, 2001). Généralement, la liaison de ces protéines agit en synergie avec un autre activateur; c'est le cas par exemple de Grb2 qui, en se liant à N-WASP, augmente l'activité de nucléation d'Arp2/3 et potentialise l'effet activateur de Cdc42 (Carlier *et al.*, 2000). D'autres protéines à domaines SH3 sont connues pour interagir avec WASP telles que WISH (Fukuoka *et al.*, 2001), l'intersectine (Hussain *et al.*, 2001), la

syndapine (Qualmann *et al.*, 1999), faisant ainsi de N-WASP une protéine potentiellement impliquée dans de nombreux processus.

II. Les GTPases monomériques de la famille Rho

II-1. La superfamille Ras

Les membres de la famille Rho sont des GTPases de la superfamille Ras (apparentée avec le proto-oncogène ras). Elle sont aussi appelées petites protéines G en raison de leur petit poids moléculaire (compris entre 20 et 25 kDa), et sont présentes dans toutes les cellules eucaryotes. Cette superfamille comprend plus de 150 protéines impliquées dans de très nombreuses fonctions cellulaires et se divise en cinq groupes: Ran, Ras, Rab, Arf, et Rho (voir figure 23).



Avant d'entrer dans le vif du sujet et de décrire les GTPases de type Rho, j'aimerais tout d'abord décrire le fonctionnement général d'une protéine G monomérique. Les petites protéines G sont constituées d'un seul monomère et possèdent un domaine de liaison au GTP (Guanosine Tri Phosphate) très conservé, commun avec les protéines G hétérotrimériques et

d'autres GTPases. Ces protéines sont des interrupteurs moléculaires qui ont la capacité de stimuler ou d'inhiber une cascade moléculaire, en cyclant entre des formes active et inactive déterminées en fonction de l'interaction avec le nucléotide. En effet, seule la forme active qui est liée au GTP peut interagir avec les effecteurs, alors que la forme liée au GDP (Guanosine Di Phosphate) en est incapable. L'intervention d'une petite protéine G dans une voie cellulaire dépend donc du ratio cellulaire entre ses formes GDP et GTP, ainsi que de molécules régulatrices telles que des facteurs d'échange ou des protéines stimulant l'activité GTPasique qui pourront faire pencher l'équilibre vers les formes liées au GTP ou au GDP, respectivement. La régulation de l'activité des GTPases sera abordée de façon plus détaillée dans la troisième partie du manuscrit.

Le domaine supportant la liaison et l'hydrolyse du GTP est organisé en cinq régions G1 à G5 et six feuillettes β bordés par cinq hélices α (voir figure 24). La conservation de ces domaines suppose une structure et un mode de fonctionnement relativement conservés.

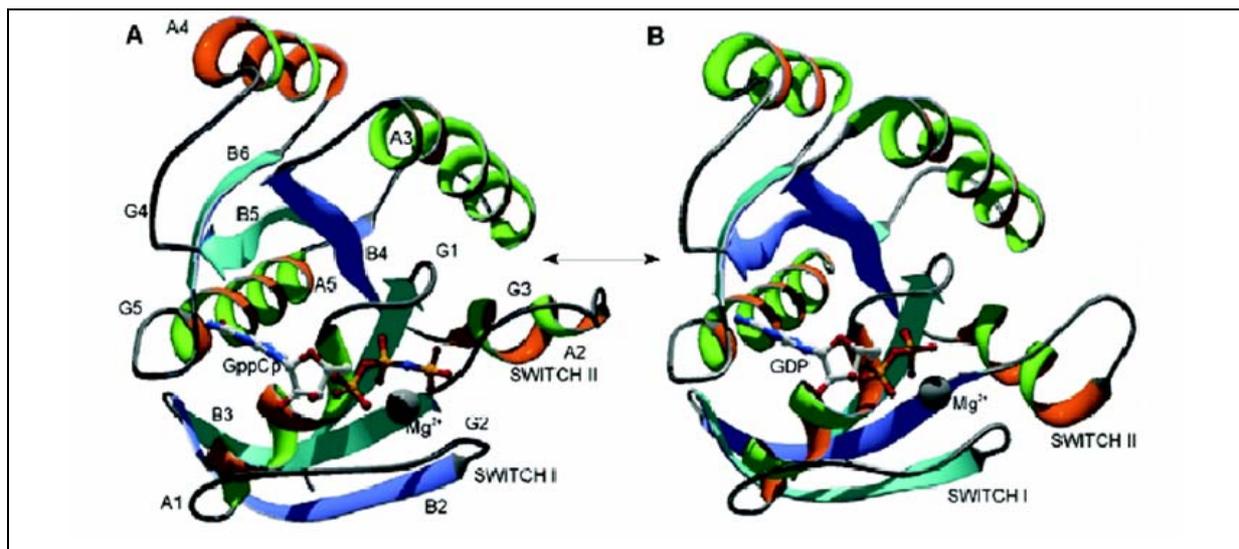


Figure 24: Représentation schématique du domaine de la GTPase ras liant les nucléotides.

Les domaines conservés G1 à G5 sont représentés, ainsi que les 5 hélices α (A1 à A5) et les 6 feuillettes β (B1 à B6). En A, la protéine est complexée avec un ion Mg^{2+} et le GppCp, un analogue non hydrolysable du GTP utilisé afin de mettre en évidence la structure des domaines switch. En B, après hydrolyse du GTP, la conformation des domaines switch I et II a changé. (Paduch *et al.*, 2001).

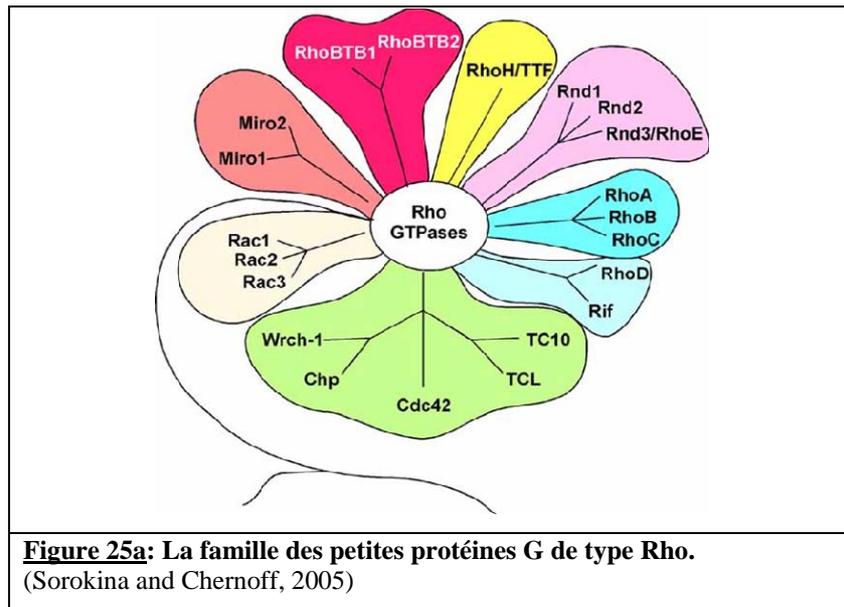
Ce domaine va accueillir le GTP, accompagné d'un ion Mg^{2+} . La fixation du GTP va faire changer de conformation deux domaines appelés switch I et switch II qui vont se retrouver liés au phosphate γ du GTP. C'est dans cette conformation que les GTPases peuvent interagir avec leurs effecteurs. Une fois le GTP hydrolysé en GDP + Pi, les deux régions switch se "relâchent" et adoptent la conformation spécifique de la forme liée au GDP.

Les protéines G de la superfamille Ras sont présentes dans tous les processus cellulaires et j'ai choisi de résumer les principales fonctions des différentes familles de protéines G monomériques dans le tableau suivant:

Tableau 3: les principales fonctions des protéines G de la superfamille ras

Famille	Fonctions cellulaires
Ran (Ras-like nuclear)	Transport bi-directionnel de molécules entre le cytoplasme et le noyau (Pemberton and Paschal, 2005). Régulation de l'assemblage du fuseau mitotique, réplication de l'ADN, et assemblage de l'enveloppe nucléaire (Li <i>et al.</i> , 2003a)
Ras (Ras sarcoma)	Impliquées dans la signalisation et la prolifération au cours des phénomènes cancéreux (Eckert <i>et al.</i> , 2004)
Rab (Ras-like proteins in brain)	Régulation du trafic vésiculaire entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique, et entre le reticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Implication dans les phénomènes de fusion (Zerial and McBride, 2001; Jordens <i>et al.</i> , 2005)
Arf (ADP-ribosylation factor)	Régulation du transport vésiculaire (Nie <i>et al.</i> , 2003), implication au cours de l'exocytose (Vitale <i>et al.</i> , 2002) et de la biogénèse des vésicules de sécrétion (Faundez <i>et al.</i> , 1997)
Rho (Ras homologous)	Régulation du cytosquelette d'actine, polarité cellulaire, migration, trafic membranaire, phénomènes cancéreux (Jaffe and Hall, 2005; Ridley, 2006)

Une de ces cinq familles nous intéresse plus particulièrement. Il s'agit des GTPases de type Rho, dans la mesure où elles sont impliquées dans de nombreux processus permettant la régulation du cytosquelette d'actine. De plus, elles ont émergé ces dernières années comme étant des régulateurs clé du trafic membranaire. Chez les mammifères, les protéines Rho sont au nombre de 21 (figure 25a), et les plus étudiées sont Rho, Rac et Cdc42. La majorité de ces protéines sont situées au niveau de la membrane plasmique, et on les retrouve sur d'autres compartiments tels que l'appareil de Golgi, les mitochondries, ou encore les endosomes (Ridley, 2006). La localisation de ces protéines peut être due à certaines modifications post-traductionnelles en C-terminal. En effet, les GTPases de la famille Rho possèdent une séquence particulière (C-A-A-X) qui peut subir des ajouts de groupements lipidiques de type farnésyl, géranylgeranyl, palmitoyl ou encore des groupements méthyles.



Les GTPases de la famille Rho sont impliquées dans de nombreuses fonctions vitales aussi variées que le cycle cellulaire, la migration, la morphogénèse, le trafic membranaire ou encore l'adhésion cellulaire (voir figure 25b). Etant donné nos travaux sur la dynamique de l'actine et sa régulation par les GTPases de la famille Rho, je traiterai de façon plus détaillée l'implication de ces protéines dans les fonctions ayant trait au cytosquelette d'actine et au trafic membranaire.

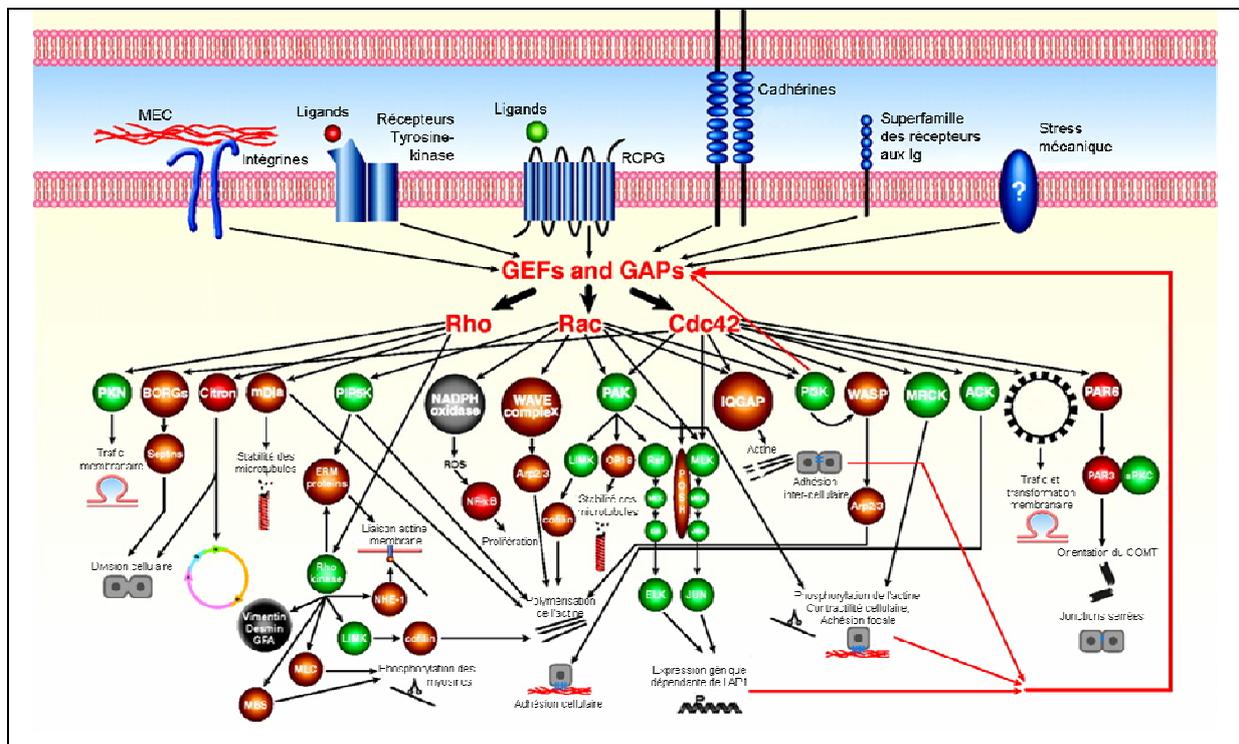
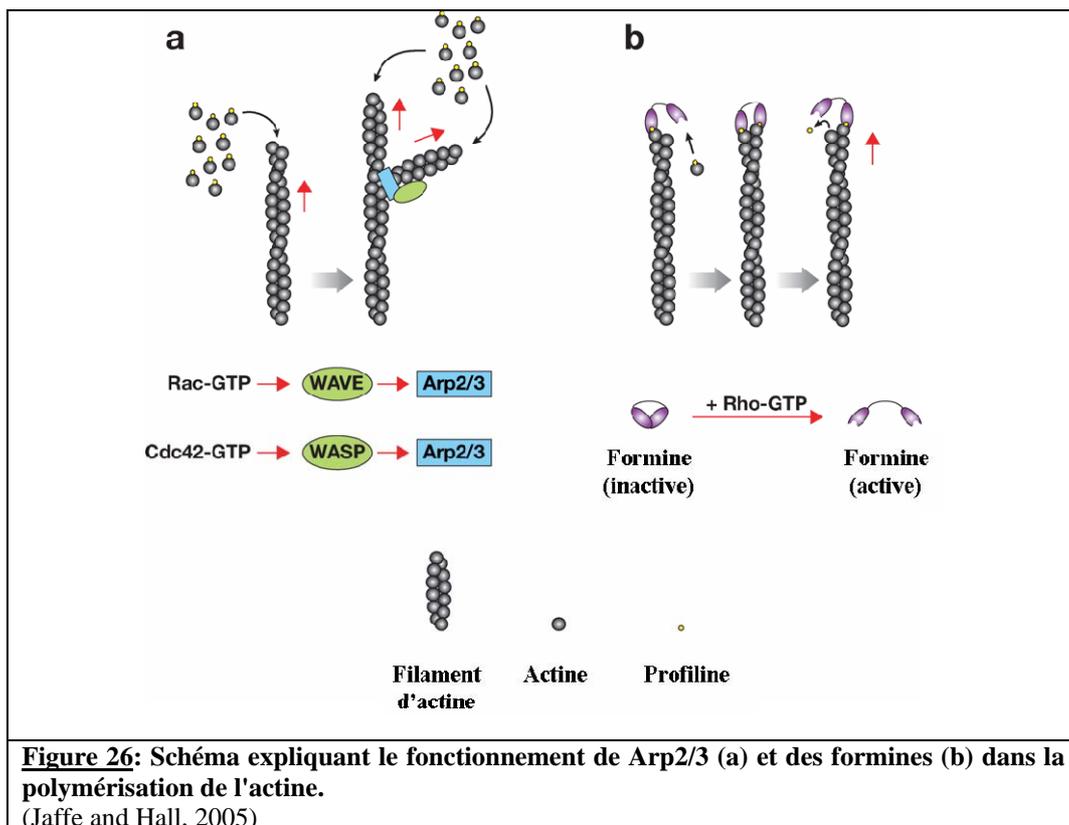


Figure 25b: Représentation de toutes les fonctions connues des GTPases de la famille Rho.
(Schwartz, 2004).

II-2. Rho et le cytosquelette d'actine

La partie la plus importante des fonctions exercées par les Rho passe par leur intervention sur le cytosquelette d'actine. C'est au début des années 1990 que l'équipe d'Alan Hall a fait le lien entre l'organisation du cytosquelette et les protéines Rho. En effet, l'activation de Rho, Rac ou Cdc42 mène respectivement à la formation de câbles d'actine (ou fibres de stress), de lamellipodes et de filopodes (Ridley and Hall, 1992; Ridley *et al.*, 1992). Cet ensemble d'effets spécifiques démontrait l'existence de toute une série de voies de transduction très définies, contrôlées par chaque GTPase, et menant à la formation et à l'organisation de filaments d'actine.

Le contrôle de la dynamique de l'actine par les protéines Rho peut passer par l'activité coordonnée de différents types d'effecteurs. Les deux principaux sont Arp2/3 et les formines (voir figure 26).



Concernant la structure et le mode d'action d'Arp2/3, on se référera au chapitre I-2-b de cette partie. Cdc42 peut activer la polymérisation d'actine *via* Arp2/3 en passant par une cascade impliquant N-WASP alors que Rac passera plutôt par WAVE. Les formines

représentent aussi un mécanisme important d'induction de la polymérisation d'actine chez les eucaryotes. Le mode de nucléation de l'actine via les formines reste toutefois encore obscur. Chez la drosophile, Rho stimule ce processus via mDia1, une formine apparentée à diaphanous (Diaphanous Related Formin), qui est une cible directe de Rho. La GTPase activée se lie à la formine, lève l'auto-inhibition constitutive de la protéine et expose ainsi le domaine FH2 (Formin Homology). C'est au niveau de ce domaine caractéristique des formines que peut se lier l'extrémité B du filament d'actine (Zigmond, 2004). mDia1 contient aussi un domaine FH1 essentiel qui interagit avec un dimère cofiline/actine qu'il "amène" à l'extrémité du filament d'actine. Une fois que mDia1 a ajouté sa pierre à l'édifice, il reste toujours lié au filament d'actine, prêt à ajouter de nouveaux monomères. On se trouve ici dans une configuration d'allongement du filament, alors que Arp2/3 a plutôt tendance à créer des branchements sur les microfilaments. Toutefois, le mécanisme par lequel les monomères s'assemblent ou encore les raisons pour lesquelles mDia1 reste attachée à l'actine sont encore mal compris.

Les protéines Rho agissent sur les mécanismes de polymérisation de l'actine mais aussi sur la stabilisation des filaments ainsi générés. La stabilisation la mieux caractérisée est celle régulée par ROCK. Elle met en jeu les filaments contractiles d'actine/myosine dont la synthèse est induite par Rho. ROCK est une sérine/thréonine kinase qui peut inhiber la phosphatase de la chaîne légère de la myosine (MLC: Myosin Light Chain). Cela a pour effet d'augmenter la phosphorylation de la MLC et de promouvoir l'activité d'assemblage de la myosine II (Riento and Ridley, 2003).

II-3. Rho et le trafic membranaire

II-3-a. Dynamique de la membrane plasmique

Les protéines Rho sont aussi connues pour leur implication dans les phénomènes de dynamique des membranes (Ridley, 2006). La dynamique de la membrane plasmique peut prendre plusieurs aspects, comme les lamellipodes, les filopodes ou les microvilli.

Les lamellipodes sont de larges expansions de membrane plasmique retrouvées à l'avant des cellules en cours de migration et contiennent un important réseau de filaments d'actine régulés par les GTPases Rac et Cdc42. Lors du processus de phagocytose qui nécessite l'extension de membrane plasmique autour d'un micro-organisme, Rac et Cdc42 sont aussi mises en jeu (Niedergang and Chavrier, 2005).

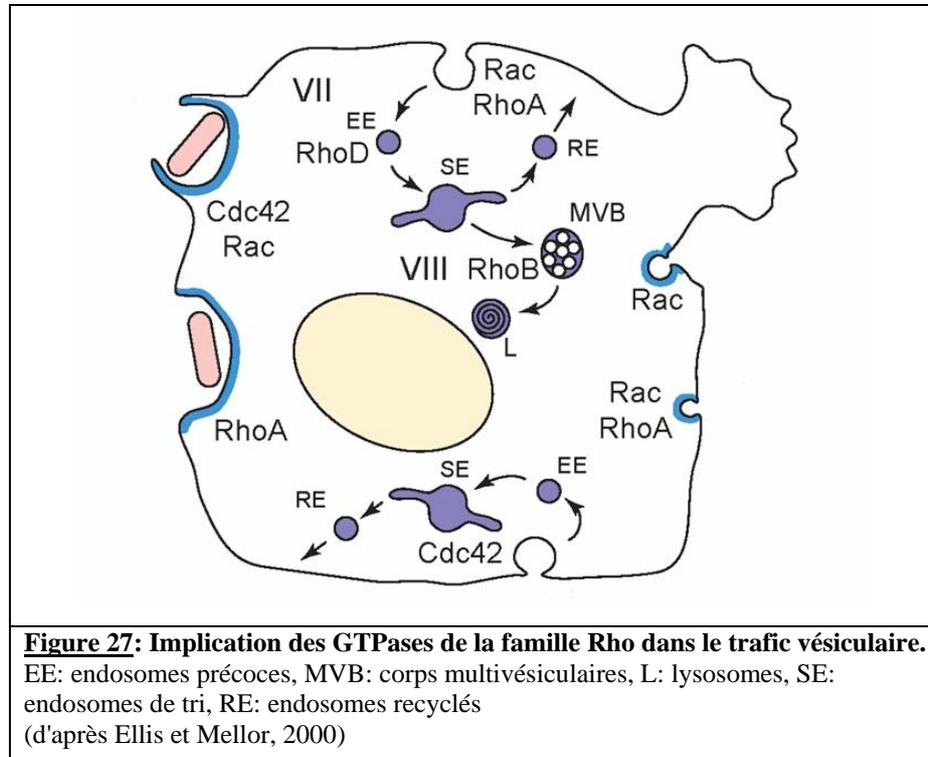
Les filopodes sont des expansions de membrane plasmique qui ont l'aspect de doigts et qui contiennent des filaments d'actine organisés en faisceaux parallèles. Ils sont importants dans

tous les processus de perception de l'environnement par la cellule, que cela concerne d'autres cellules ou des facteurs solubles dans le milieu extra-cellulaire. Là aussi, les GTPases de la famille Rho sont impliquées : Rac1 et Rac2, Cdc42 mais aussi Wrch1, RhoD et Rif (Aspenstrom *et al.*, 2004).

Les microvilli sont aussi des expansions membranaires contenant des faisceaux parallèles d'actine qui peuvent être rapidement désassemblés en réponse à un stimulus spécifique. Ils sont localisés à la surface de nombreux types cellulaires, comme par exemple dans les lymphocytes ou encore dans les cellules épithéliales des intestins, où ils jouent un rôle important dans l'absorption des nutriments. Le mode de nucléation de l'actine est encore mal connu au sein de ces structures, et il semblerait que WASP ne soit pas impliqué (Majstoravich *et al.*, 2004).

II-3-b. Trafic vésiculaire

Plusieurs GTPases de la famille Rho se trouvent localisées sur des membranes de compartiments intracellulaires et peuvent ainsi agir sur le trafic vésiculaire à plusieurs niveaux (figure 27).

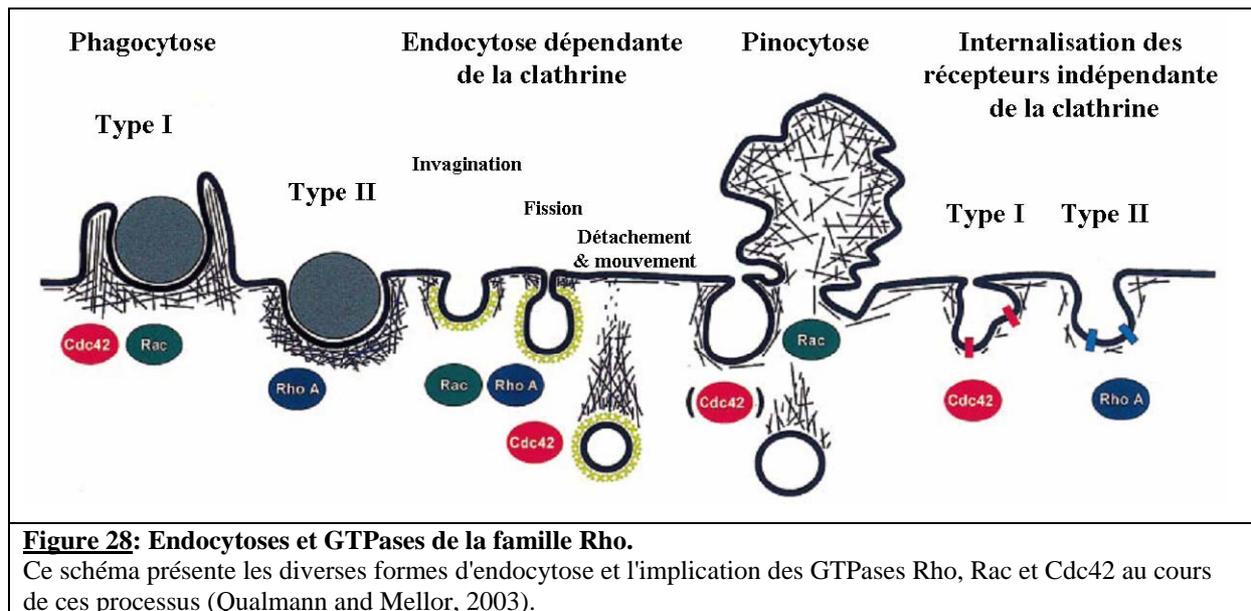


C'est le cas de Cdc42, qui est retrouvée au niveau de l'appareil de Golgi. Elle y active N-WASP et permet ainsi de réguler le transport du compartiment golgien vers le réticulum

endoplasmique (Luna *et al.*, 2002). Cdc42 peut aussi se lier au "coatome" recouvrant les vésicules golgiennes, inhibant ainsi son interaction avec la dynéine et par conséquent le transport permis par ce moteur moléculaire des microtubules (Chen *et al.*, 2005). Les protéines TCL et TC10, dont les séquences sont apparentées à celle de Cdc42, ont aussi un rôle dans les processus de trafic vésiculaire. En effet, TC10 régulerait la translocation du transporteur du glucose GLUT4 induit par l'insuline (Jiang *et al.*, 2002) alors que TCL serait impliquée dans le mouvement des endosomes contenant les récepteurs à la transferrine (de Toledo *et al.*, 2003). Concernant les endosomes, RhoB a été identifiée sur ces organelles et son rôle serait de ralentir le trafic des récepteurs membranaires tels que le récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor) vers les endosomes tardifs (Gampel *et al.*, 1999). Une autre GTPase, RhoD, régule la motilité des endosomes précoces en activant séquentiellement hDia2C et la kinase c-Src (Gasman *et al.*, 2003).

Qu'en-est-il des phénomènes d'exo- et endocytose qui nous intéressent particulièrement ici? Diverses protéines de la famille Rho semblent y être impliquées. L'importance de Rac et Cdc42 au cours de l'exocytose dans les cellules β pancréatiques a été démontrée en 1997 grâce à l'utilisation de toxines inhibant spécifiquement différentes protéines Rho (Kowluru *et al.*, 1997). L'implication de Rac et Cdc42 a été mise en évidence dans les mastocytes (Hong-Geller and Cerione, 2000), et le rôle de Cdc42 au cours de l'exocytose dans les cellules chromaffines a été confirmé par Gasman et collaborateurs (Gasman *et al.*, 1999).

Le phénomène d'endocytose nécessite lui aussi l'intervention des GTPases de la famille Rho. L'endocytose peut être considérée selon plusieurs angles, et l'un des plus couramment utilisé est la comparaison entre endocytoses dépendante ou indépendante de la clathrine. Concernant les processus d'endocytose ne dépendant pas de la clathrine, ils regroupent les phénomènes tels que la phagocytose, la macropinocytose et l'internalisation de certains types de récepteurs comme les récepteurs possédant un groupement GPI ou les récepteurs à l'interleukine-2 (figure 28).



Au cours de la phagocytose, Cdc42 et Rac1 sont impliqués dans le contrôle de la formation de la cupule de phagocytose qui englobera la particule à détruire (Massol *et al.*, 1998). L'endocytose dépendante de la clathrine, quant à elle, est le phénomène le plus courant lors de l'internalisation de récepteurs et de la récupération de vésicules après exocytose. Les Rho interviennent de façon relativement importante au cours de l'endocytose dépendante de la clathrine (Lamaze *et al.*, 1996), et le rôle de Rac passerait par la synaptojanine2, qui est une phosphatase induisant la perte de la clathrine sur les vésicules qui en sont recouvertes (Malecz *et al.*, 2000), alors que RhoA jouerait sur le même processus mais en passant par une voie impliquant ROCK et l'endophiline (Kaneko *et al.*, 2005).

III. Rôle de l'actine au cours de l'exocytose : un problème non résolu

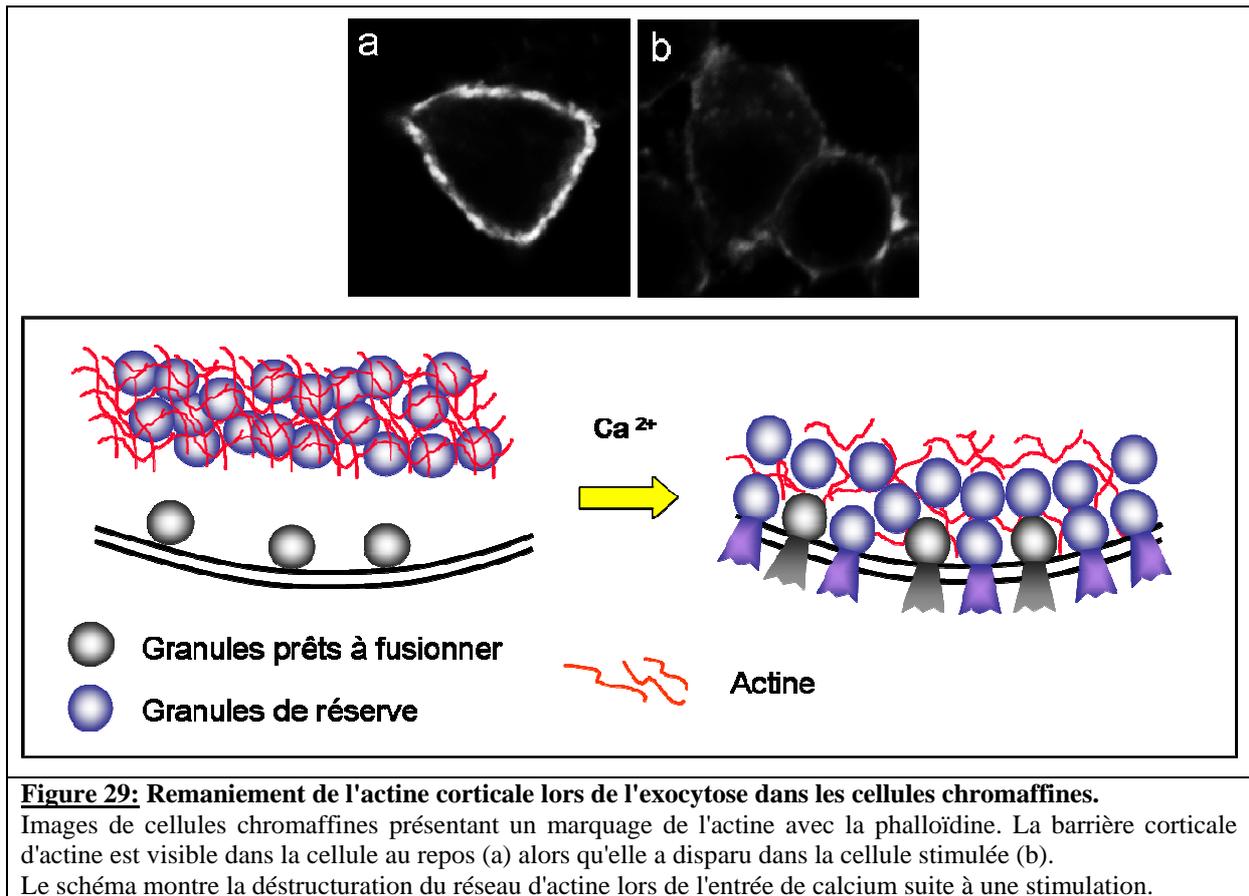
III-1. Organisation de l'actine dans les cellules neuroendocrines

Dans des types cellulaires aussi divers que les mélanotrophes, les cellules chromaffines, les cellules pancréatiques ou les mastocytes, l'actine forme un réseau complexe et dynamique de filaments situé sous la membrane plasmique (Orci *et al.*, 1972; Aunis and Bader, 1988; Chowdhury *et al.*, 1999; Pendleton and Koffer, 2001). Dans des cellules chromaffines, l'utilisation d'anticorps dirigés contre l'actine montre qu'elle est présente sous forme monomérique dans l'ensemble du cytoplasme, avec toutefois la présence de filaments uniquement dans la région subplasmalemmale (Lee and Trifaro, 1981; Sontag *et al.*, 1988). Toujours dans les cellules chromaffines, l'observation de l'actine en microscopie électronique a montré un réseau de filaments non uniforme orienté parallèlement à la membrane plasmique

et qui emprisonne les granules de sécrétion (Nakata and Hirokawa, 1992). Le réseau d'actine est organisé par rapport à la membrane plasmique à laquelle il peut se lier via des protéines telles que la fodrine (Langley *et al.*, 1986), ou les membres de la famille Ezrine, Radixine, Moesine (ERM) (Tsukita and Yonemura, 1999), mais il peut aussi se lier à l' α -actinine, présente sur la membrane des granules chromaffines (Bader and Aunis, 1983).

III-2. Le réseau cortical d'actine: une barrière bloquant l'accès des granules à la membrane plasmique

Les techniques les plus couramment utilisées pour étudier la relation entre l'actine et une fonction cellulaire est de perturber l'organisation du cytosquelette. La nature a mis à la disposition de la science toute une série de molécules et de toxines issues de bactéries, de champignons ou d'éponges de mer qui peuvent agir sur l'actine à différents niveaux (Spector *et al.*, 1999). Ces molécules peuvent empêcher la polymérisation des filaments ou provoquer la dépolymérisation, comme la latrunculine, les cytochalasines et les toxines clostridiales, alors que la jasplakinolide et les phallotoxines vont plutôt stabiliser l'actine filamenteuse et figer ainsi le cytosquelette. Ces drogues ont été massivement utilisées au cours des 30 dernières années pour étudier le rôle de l'actine au cours de divers processus cellulaires, dont l'exocytose. Dans la plupart des études, les résultats indiquaient que la stabilisation de l'actine inhibait l'exocytose alors que sa dépolymérisation favorisait l'activité sécrétrice (Orci *et al.*, 1972; Matter *et al.*, 1989; Chowdhury *et al.*, 1999; Pendleton and Koffer, 2001). L'idée principale résultant de ces données était donc que l'actine joue un rôle de barrière physique empêchant les granules d'accéder à la membrane plasmique, et que sa déstructuration est nécessaire au processus d'exocytose (figure 29).



Le maintien de cette barrière d'actine peut être assuré par des protéines de réticulation telles que la vinculine, la filamine ou encore la spectrine (Winder and Ayscough, 2005). Dans notre laboratoire, Gasman et collaborateurs ont également mis en évidence un rôle de la GTPase RhoA granulaire dans la stabilisation du réseau d'actine cortical *via* l'activation d'une cascade faisant intervenir la phosphatidylinositol-4-kinase (Gasman *et al.*, 1998).

L'autre idée résultant du concept de barrière physique est la nécessité d'un remodelage de l'actine au cours des phases de stimulation afin que les granules puissent accéder à la membrane plasmique. L'élément déclencheur de l'exocytose est l'entrée de calcium dans le cytoplasme, qui va activer les protéines de fragmentation de l'actine. En effet, il est nettement démontré que le réseau d'actine est dépolymérisé grâce à l'intervention de la scindérine, stimulée en présence de calcium (Dumitrescu Pene *et al.*, 2005).

III-3. Quel rôle actif pour l'actine ?

L'actine a un rôle de barrière physique et de nombreux résultats l'indiquent clairement. Toutefois, les premiers indices suggérant un rôle plus actif du cytosquelette ont été donnés par les études de Orci et collaborateurs dès 1972 (Orci *et al.*, 1972). En effet, un aspect inattendu

de l'effet dépolymérisant des drogues utilisées s'est manifesté lorsque celles-ci étaient appliquées en quantité importante. Si la dépolymérisation de l'actine induite par certaines toxines augmente l'activité sécrétrice des cellules, on obtient une inhibition de la sécrétion lorsque la concentration des drogues est élevée, ce qui correspond à une destruction massive du cytosquelette d'actine. Une sécrétion biphasique a donc été mise en évidence dans les cellules pancréatiques, les PC12 et les mastocytes (Matter *et al.*, 1989; Li *et al.*, 1994; Pendleton and Koffer, 2001), suggérant ainsi la nécessité de la présence d'une structure minimale d'actine indispensable au bon déroulement de l'exocytose.

L'actine ne se limiterait donc plus à une barrière physique, elle aurait aussi un rôle positif. Mais de quelle façon et dans quelle étape peut-elle intervenir? Sert-elle de support pour le transport des granules jusqu'aux sites d'exocytose? Intervient-elle au cours de l'exocytose elle-même? Si oui, dans quelle étape? Ce sont ces questions que nous nous sommes posées. La régulation du cytosquelette au cours de ce phénomène était déjà un sujet d'étude dans le laboratoire, et sachant à quel point les protéines Rho sont impliquées dans la régulation de la dynamique de l'actine, il était intéressant de chercher à savoir s'il y avait un lien entre ces GTPases et l'actine au cours de l'exocytose. En 1998 et 1999, Stéphane Gasman a mis en évidence l'implication des protéines Rho au cours de ce processus (Gasman *et al.*, 1998; Gasman *et al.*, 1999). De façon intéressante, il a montré en utilisant une combinaison de toxines bactériennes inhibant spécifiquement différentes protéines Rho que l'activité de Cdc42 semblait importante au cours de l'exocytose. A partir de ces travaux, il a proposé l'hypothèse que Cdc42 puisse jouer un rôle actif en couplant la dynamique de l'actine à la machinerie de l'exocytose. De plus, d'autres études ayant démontré la participation de Cdc42 au cours de l'exocytose dans les mastocytes et dans les cellules β pancréatiques (Kowluru *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1998), Cdc42 apparaissait comme un candidat de choix pour réguler cette fameuse fonction positive de l'actine. Si cette hypothèse s'avère vraie, alors la mise en évidence de la voie effectrice de Cdc42 devrait nous permettre d'apporter quelques éléments de réponse quant au rôle de l'actine. Lorsque je suis arrivée en 2002, Stéphane Gasman venait de mettre en place un tel projet. Mon travail de thèse a commencé à ce moment-là, par l'étude des effecteurs contrôlés par Cdc42.

IV. Cdc42 et N-WASP régulent l'organisation de l'actine au cours de l'exocytose régulée

IV-1. Introduction

L'hypothèse du rôle positif de l'actine au cours de l'exocytose ayant été posée, il fallait maintenant trouver quelle pouvait être la fonction de l'actine. En 1999, la démonstration du rôle actif de Cdc42 lié à l'actine au cours de l'exocytose était très indirecte, due à l'approche par les toxines (Gasman *et al.*, 1999). Dans cette étude nous avons donc voulu confirmer le rôle de Cdc42 sur la sécrétion et sur l'organisation de l'actine en utilisant des mutants dominants négatif et positif. Nous avons aussi effectué des expériences de précipitation de la forme activée de Cdc42 (pull-down) afin de mettre en évidence son éventuelle activation au cours de l'exocytose. Ayant démontré son activation et sa localisation en périphérie cellulaire, il nous restait à trouver des effecteurs potentiels pouvant faire le lien entre Cdc42 et l'actine. Cdc42 possède de nombreux effecteurs mais l'un d'entre eux, la protéine N-WASP, présentait un intérêt particulier du fait de sa capacité à stimuler la nucléation d'actine et de promouvoir la formation de nouveaux filaments *via* le complexe Arp2/3 (voir chapitre I-2-a).

Il se trouve en effet que cette protéine (Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) lie Cdc42 à la dynamique de l'actine, et ce en passant par le complexe Arp2/3 qui permet de stimuler la nucléation de l'actine et par là même de promouvoir la formation de nouveaux filaments (Rohatgi *et al.*, 1999).

Le but de ce travail était donc de trouver la voie par laquelle Cdc42 régule la dynamique de l'actine au cours de l'exocytose dans les cellules PC12. Pour cela, nous avons utilisé différents mutants de la protéine N-WASP et mis en évidence leurs effets sur l'organisation de l'actine et l'activité sécrétrice des PC12 par immunocytochimie et tests de sécrétion.

A mon arrivée en DEA, Stéphane Gasman avait démontré l'implication de Cdc42 au cours de l'exocytose, mais la voie effectrice impliquée était encore inconnue. J'ai participé à la mise en évidence de cette voie.

**Regulated exocytosis in neuroendocrine cells : a role for subplasmalemmal
Cdc42/N-WASP-induced actin filaments**

GASMAN S., CHASSEROT-GOLAZ S., MALACOMBE M., WAY M. and BADER MF.

Molecular Biology of the Cell, 2004, Vol. 15, Pages 520-531

Pages 51 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://www.molbiolcell.org/cgi/content/full/15/2/520>

La version imprimée de la thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

IV-3. Conclusion

Cette étude a permis de mettre en évidence plusieurs points importants concernant l'exocytose dans les cellules PC12. Tout d'abord, nous avons confirmé que Cdc42 est une GTPase capable de réguler l'exocytose. Par la suite, nous avons démontré que N-WASP se trouve bien être l'effecteur par lequel Cdc42 régule la dynamique de l'actine au cours de l'exocytose. Nous avons pu montrer que N-WASP joue un rôle majeur dans la stimulation de l'exocytose induite par Cdc42, en établissant que (i) lors de l'exocytose, N-WASP est recrutée en périphérie de la cellule, où elle stimule la formation de filaments d'actine, (ii) N-WASP stimule l'exocytose aussi efficacement que Cdc42, alors qu'un mutant incapable de polymériser l'actine n'a aucun effet, (iii) N-WASP est recrutée à la membrane par la forme active Cdc42-GTP. Enfin, nous avons pu localiser le complexe Arp2/3 au niveau de la membrane des granules de sécrétion et montrer qu'Arp2/3 accompagne les granules en route vers les sites d'exocytose de la membrane plasmique dans les cellules stimulées. De cette façon, l'interaction entre N-WASP, les monomères d'actine et Arp2/3 ne serait possible qu'au niveau des sites d'arrimage des granules, permettant ainsi de cibler la polymérisation de l'actine à l'interface entre le granule et la membrane plasmique. Ce contrôle temporel et spatial de la formation *de novo* de filaments d'actine constitue un rôle inédit du cytosquelette dans les phases ultimes de la sécrétion neuroendocrine (figure 30).

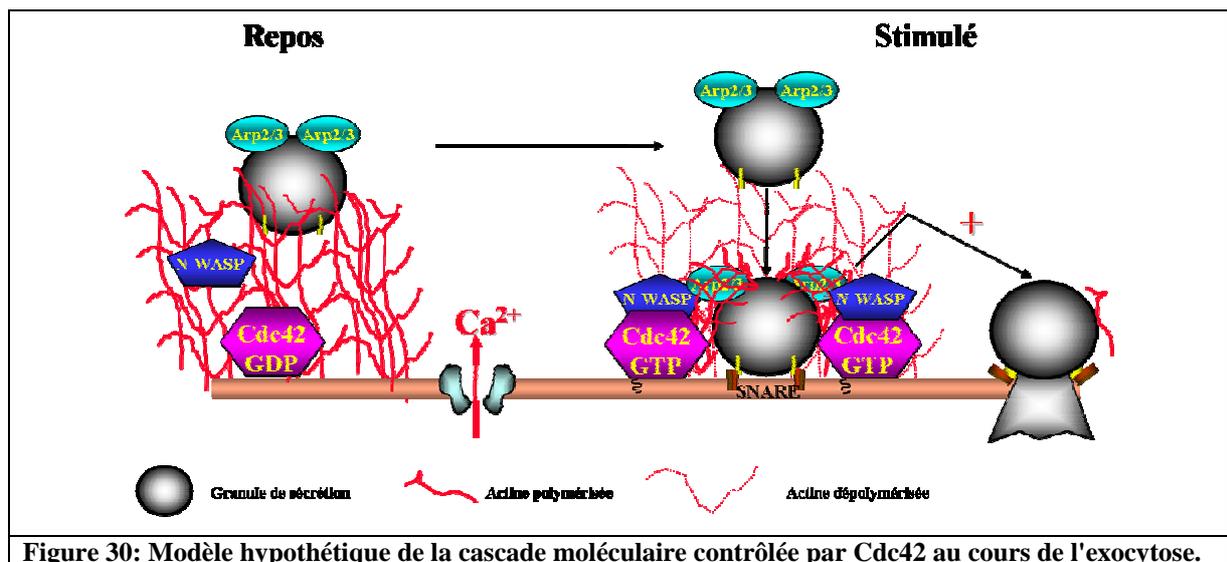


Figure 30: Modèle hypothétique de la cascade moléculaire contrôlée par Cdc42 au cours de l'exocytose.

Ces résultats répondent à certaines questions mais en posent beaucoup d'autres. Il serait évident de chercher à en savoir un peu plus sur la nature de ces filaments d'actine

nouvellement synthétisés ; ont-ils la même organisation, la même taille que ceux constituant l'actine corticale ? Sont-ils sur le granule ? Ou peut être l'entourent-ils ? Et puis, question des plus importantes, quel est leur rôle ? Sont-ils impliqués dans l'étape d'arrimage, d'amorçage (priming), de fusion ou plutôt au cours de l'endocytose faisant suite à l'exocytose ? Ces questions seront traitées au cours de la discussion générale dans la quatrième partie.

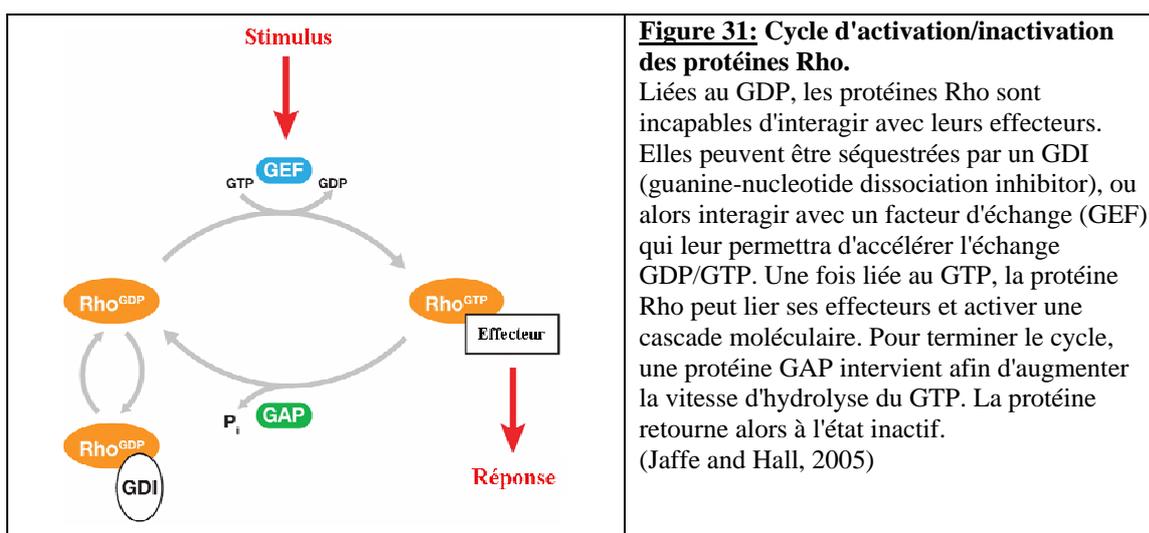
Une autre grande question découle de nos résultats. Comment l'activité de Cdc42 est-elle régulée ? Il serait intéressant en effet de mettre en évidence le facteur d'échange stimulant l'activité GTPasique de Cdc42 impliqué au cours de l'exocytose. C'est cette dernière interrogation qui a été le point de départ de l'étude suivante.

Troisième partie :

Activation de Cdc42 au cours de l'exocytose par son facteur d'échange, l'intersectine-1L

I- Régulation des protéines G monomériques

Les résultats précédents démontrant l'importance de Cdc42 au cours de l'exocytose nous ont amené à nous interroger sur le mode de régulation de l'activité de Cdc42, et plus particulièrement sur son activation. Les GTPases sont des interrupteurs moléculaires oscillant entre un état inactif lié au GDP et un état actif lié au GTP. Le passage à l'état actif est contrôlé par un facteur d'échange (GEF pour Guanine-nucleotide Exchange Factor) et le retour à l'état inactif par une protéine activatrice (GAP pour GTPase-Activating Protein) (figure 31).



En effet, l'activité intrinsèque GTPasique des petites protéines G est faible, et pour une efficacité maximale au cours des divers processus cellulaires elle est accélérée par les GAP. De même, la vitesse d'échange du GDP en GTP est augmentée par l'intervention d'un GEF. Le troisième type de protéine régulant l'activité des GTPases est le GDI (Guanine-nucleotide Dissociation Inhibitor), qui inhibe la dissociation du GDP et de la protéine G.

J'ai choisi de passer en revue les généralités concernant ces trois régulateurs et je me focaliserai ensuite sur les GEF de Rho, qui concernent plus particulièrement nos travaux.

I-1. Les protéines activant l'hydrolyse du GTP (GAP)

Les protéines activatrices (GAP) inactivent les GTPases en accélérant la vitesse d'hydrolyse du GTP en GDP. Leur seul domaine commun est le domaine catalytique GAP d'environ 330 acides aminés responsable de cette activité. Les mécanismes d'interaction entre les GAP et leurs GTPases diffèrent d'une famille à l'autre, il est difficile d'établir des mécanismes d'action communs (Bernards, 2003). Les GAP sont extrêmement nombreuses pour chaque famille de GTPase : on en a recensé 60 pour Rho, 14 pour Ras, 26 pour Arf, 52 pour Rab et une seule pour Ran (Bernards, 2003).

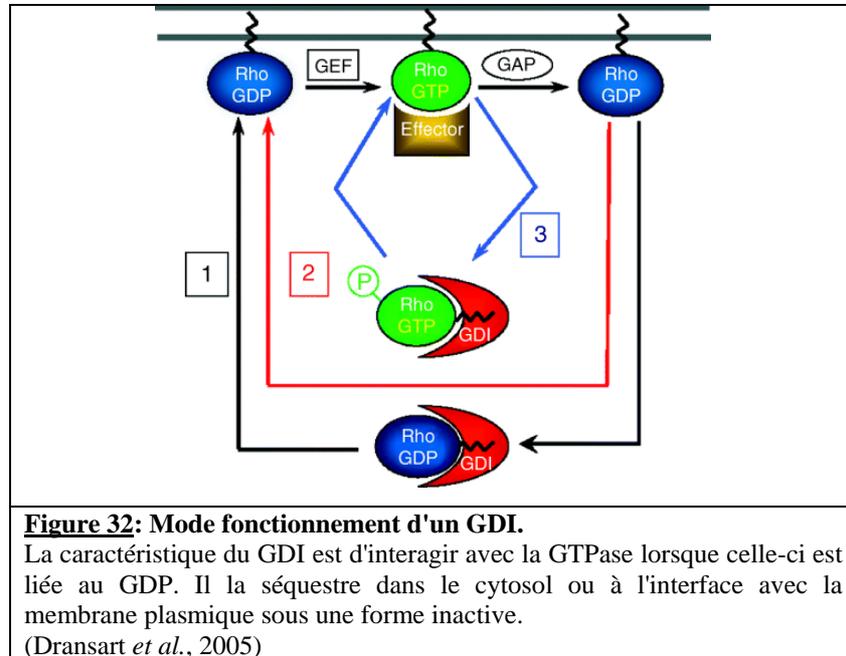
Les GAP sont elles-mêmes régulées par des mécanismes aussi divers que l'interaction protéine/protéine, la phosphorylation, l'interaction avec des phospholipides, la dégradation protéolytique ou encore la translocation (Bernards and Settleman, 2005). Toutefois, les familles de GAP présentant le plus de motifs potentiels d'interaction avec des protéines ou des lipides sont celles des GTPases Rho et Arf. Une étude récente a mis en évidence la régulation de p190RhoGAP (qui peuvent contrôler l'activité de Rho et Rac) par les phospholipides. En effet, la phosphatidylsérine inhibe l'activité de p190 sur Rho et stimule celle de p190 sur Rac, permettant ainsi de passer d'une GTPase à l'autre en fonction de l'environnement lipidique (Ligeti *et al.*, 2004).

Certaines protéines contiennent un domaine GAP sans pour autant catalyser l'hydrolyse du GTP par les GTPases avec lesquelles elles interagissent. Les protéines IQGAP en sont l'exemple parfait. Elles interagissent avec Rac1 et Cdc42 *via* leur domaine de type RasGAP mais ne stimulent pas l'hydrolyse du GTP (Brill *et al.*, 1996; Hart *et al.*, 1996). Il en est de même pour la sous-unité p85 α de la PI-3 kinase qui a une structure semblable à p50RhoGAP et qui peut lier Cdc42 et Rac1 sans avoir aucun effet sur leur activité (Zheng *et al.*, 1994). Toutes les familles des GTPases Ras possèdent des GAP, et de façon intéressante on pourrait penser que les GAP soient spécifiques d'un type de GTPases. Or il se trouve que ce n'est pas le cas, comme le prouve par exemple p120GAP, une GAP de la famille Ras qui stimule aussi l'activité de Rab5 (Liu and Li, 1998).

I-2. Guanine-nucleotide dissociation inhibitor (GDI)

Les GDI sont un peu à part dans la régulation de l'activité des GTPases. Les seules GTPases régulées par les GDI sont Rho, Ran et Rab. Les protéines GDI peuvent d'une part séquestrer les GTPases inactives liées au GDP, sous forme cytosoluble ou à l'interface avec la membrane plasmique, faisant ainsi office de protéines chaperonnes. D'autre part, elles

peuvent contrôler l'adressage/délocalisation de la GTPase au niveau de son site d'action. L'interaction entre le GDI et la GTPase ne peut se faire que si celle-ci possède un groupement géranylgeranyl ou farnésyl en C-terminal (figure 32).



Comparé au grand nombre de GEF et de GAP recensés pour les GTPases de la famille Rho, il n'y a que trois RhoGDI qui ont été mis en évidence chez les mammifères (Dransart *et al.*, 2005). La forme la plus abondante, rhoGDI1, est ubiquitaire et peut former des complexes cytosoliques avec la plupart des protéines Rho. RhoGDI2 est plutôt retrouvé dans les cellules hématopoïétiques et aurait une affinité particulière avec Rac1 (Gorvel *et al.*, 1998). Enfin, RhoGDI3 présente une localisation spécifique au niveau de l'appareil de Golgi et serait spécifique de RhoG *in vivo*, alors qu'il peut lier plusieurs protéines Rho ainsi que d'autres RhoGDI *in vitro* (Brunet *et al.*, 2002).

Ces protéines sont caractérisées par une conformation « déstructurée » lorsqu'elles ne sont pas liées aux GTPases. L'interaction entre les RhoGDI et les GTPases Rho se fait *via* les régions terminales. La partie C-terminale des GDI lie l'extrémité C-terminale portant le groupement géranylgeranyl de la GTPase et reconnaît la région switch II, tandis que la région N-terminale peut interagir avec switch I et II. Il semblerait que ce soit la partie N-terminale des RhoGDI qui soit responsable de la fonction de stabilisation de la GTPase sous sa forme liée au GDP, et que leur rôle ne soit pas d'inhiber à proprement dit la dissociation entre le GDP et la protéine G mais plutôt d'empêcher l'action du facteur d'échange. D'ailleurs il est intéressant de noter que le site de liaison du GEF est le même que celui du GDI, et que donc

la dissociation GTPase-GDI est un pré-requis à l'activation de la protéine G par son GEF (Robbe *et al.*, 2003). La dissociation du Rho-GDI et de la protéine Rho peut aussi être la conséquence de l'interaction du complexe avec d'autres protéines, comme par exemple les protéines de la famille ERM (ezrine, radixine, moésine). En effet, il a été montré *in vitro* que la liaison de la radixine provoque la dissociation RhoA/GDI et l'activation de RhoA (Takahashi *et al.*, 1998). De même, les intégrines ont la capacité d'augmenter la dissociation Rac1/rhoGDI (Del Pozo *et al.*, 2002). Concernant les liaisons potentielles entre GDI et GEF, il y a assez peu de données sur le sujet. Une étude a mis en évidence l'interaction entre Vav1 et rhoGDI2 dans les lymphocytes T activés, et les résultats suggèrent que Vav1 contribuerait à déplacer rhoGDI2 de sa GTPase cible (Groysman *et al.*, 2002).

I-3. Les facteurs d'échange (GEF)

A l'exception peut être de Rnd, tous les groupes de GTPases de la superfamille Ras possèdent des facteurs d'échange qui accélèrent l'échange GDP-GTP. Ces protéines se différencient des autres protéines interagissant avec les GTPases car elles se lient plutôt à la forme "sans nucléotide" (Cherfils and Chardin, 1999). L'interaction entre le facteur d'échange et la GTPase a lieu au niveau des domaines switch I et II, et la présence du GEF donnera lieu à un changement de conformation permettant la liaison du GTP avec la GTPase. En revanche, le GTP lié aux domaines switch sera en compétition avec le GEF et ce dernier se détachera de la GTPase. Toutes ces modifications d'interactions font passer le complexe GEF-GTPase par plusieurs états intermédiaires relativement instables représentés ci-dessous (G = GTPase).



Les facteurs d'échange des GTPases de type Rho, Ran et Rab présentent des mécanismes d'échange relativement similaires (voir le chapitre suivant pour plus de précisions sur les GEF des GTPases de la famille Rho).

II- GEF des Rho

II-1. Généralités

La majorité des facteurs d'échange des protéines Rho font partie de la famille Dbl (Diffuse B-cell Lymphoma), famille à laquelle appartient la protéine Dbl, un facteur d'échange de Cdc42, identifié à l'origine en tant que gène responsable de transformations cancéreuses (Hart *et al.*, 1991). Dbl contient une région de 240 acides aminés présentant une homologie avec une région de Cdc24 chez *S. cerevisiae*, qui coopère avec Cdc42 au cours du bourgeonnement et de la polarisation de la levure (Chenevert *et al.*, 1992). Dbl et Cdc24 représentaient ainsi les deux premiers membres de la grande famille de facteurs d'échange qui en compte à l'heure actuelle 69 identifiés chez l'homme.

Les GEF de la famille Dbl possèdent en C-terminal un domaine appelé DH (Dbl Homolog) associé à un domaine PH (Pleckstrin Homology). L'analyse des différences de séquence entre les domaines DH des GEF des différentes familles de GTPases montre une grande conservation au cours de l'évolution, et le séquençage des différents génomes a montré la présence de trois GEF de la famille Dbl chez la levure, 23 chez la drosophile, 18 chez le ver et environ 60 chez l'homme (Schmidt and Hall, 2002a). Mis à part la grande famille Dbl, de nouveaux types de facteurs d'échange ont été mis en évidence dans lesquels le domaine impliqué dans l'activité d'échange n'est plus le tandem DH-PH mais le domaine CZH (Meller *et al.*, 2005).

II-2. Fonctionnement et régulation

II-2-a. Famille Dbl

Les GEF de la famille Dbl interagissent avec les protéines Rho par l'intermédiaire de leur domaine DH (180 résidus environ). Ce domaine est subdivisé en trois régions conservées (CR1 à CR3), lesquelles interagissent avec les domaines switch I pour CR1 et CR3 et switch II pour CR2. La spécificité d'un GEF pour une GTPase est donnée par des interactions n'impliquant ni le domaine DH ni les domaines switch. Par exemple, Rac1 est activée par Tiam1, mais une simple mutation ponctuelle au niveau d'un acide aminé situé entre les feuillets β 2 et 3 de cette GTPase la rend insensible à Tiam1 et activable par l'intersectine-L, qui est normalement spécifique de Cdc42 (Karnoub *et al.*, 2001).

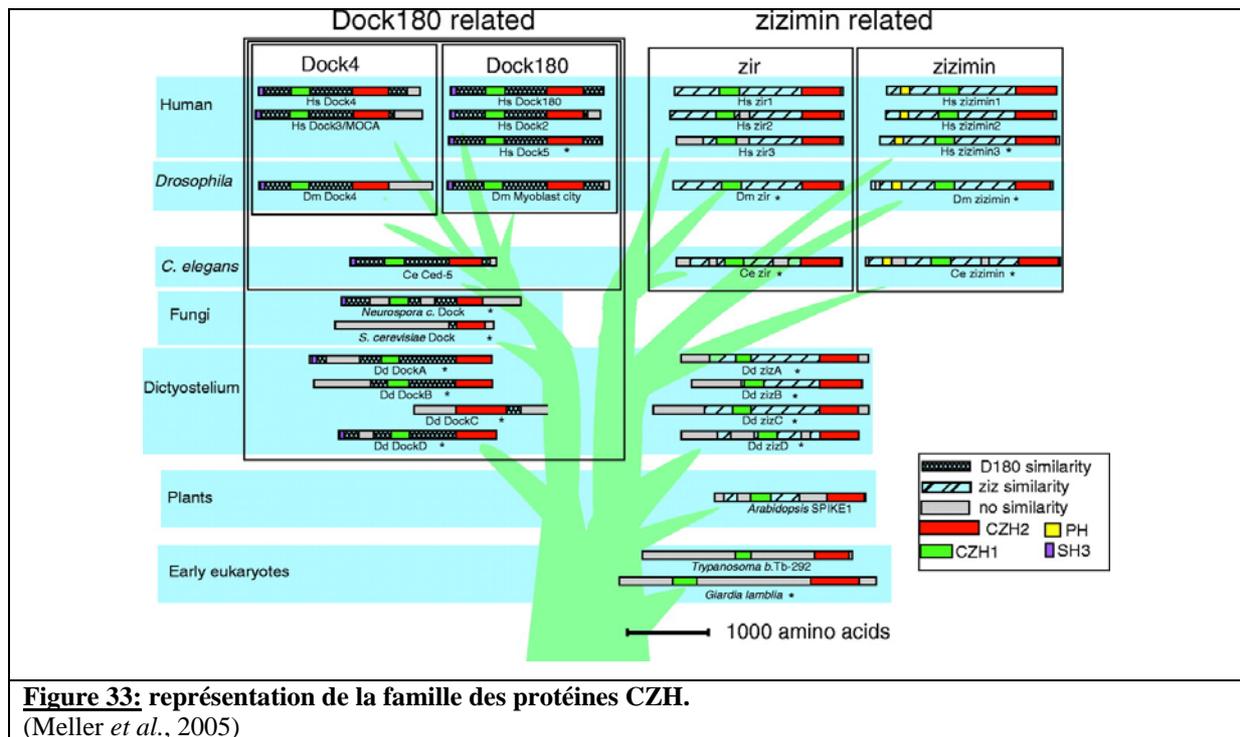
Un des modes de régulation de l'activité d'échange pourrait être la liaison à certains phospholipides, tels que le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) ou le phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP3), mais les effets sont très variables en fonctions des GEF et des GTPases. Plusieurs études ayant obtenu les mêmes variations, il est

impossible de conclure de façon formelle sur le rôle exact des phospholipides dans la régulation des facteurs d'échange. Etant donné l'affinité du domaine PH pour certains phosphoinositides tels que le PIP2, il serait possible qu'il intervienne dans la localisation du facteur d'échange. Cette hypothèse est confirmée par les travaux de Russo et collaborateurs, qui ont mis en évidence l'importance de l'interaction entre le PIP2 et le domaine PH dans la localisation mais aussi dans l'activité d'échange du GEF Dbl (Russo *et al.*, 2001). De plus, Fleming et collaborateurs ont tiré les mêmes conclusions de leur étude portant sur l'influence de la liaison entre le PIP2 et le domaine PH de Tiam1 (Fleming *et al.*, 2004). Le domaine DH est toujours associé au domaine PH, et il a été démontré que l'activité d'échange du tandem DH-PH est bien plus élevée que celle de DH seul (Rossman and Campbell, 2000), suggérant ainsi un mécanisme de coopération allostérique entre DH et PH.

La régulation de ces facteurs d'échange est mal comprise, mais certains points sont quand même connus, même s'ils ne permettent pas de mettre en place un modèle de régulation valable pour tous les GEF. Les expériences portant sur des mutants tronqués en N-terminal ont montré que beaucoup de facteurs d'échange étaient constitutivement actifs, démontrant ainsi le rôle inhibiteur des séquences en amont du domaine DH (Schmidt and Hall, 2002a). Certains facteurs d'échange Dbl seraient donc en conformation auto-inhibée et nécessiteraient l'intervention d'une tierce molécule pour être activés. C'est par exemple le cas de l'intersectine-L, qui doit se lier à N-WASP afin de pouvoir exercer son activité d'échange sur Cdc42 (Irie and Yamaguchi, 2002). Sachant que N-WASP est un effecteur de Cdc42, l'intersectine se trouve donc au centre d'une boucle de régulation rétro-active (voir la discussion de la publication 2), ce qui est aussi le cas de β -Pix avec Rac1 et la NADPH oxydase-1 (Park *et al.*, 2004). L'autre mode de régulation connu pour de nombreuses protéines d'échange est la phosphorylation, mais les effets de cette modification sur l'activité des facteurs d'échange sont variables. Dans le cas de Ras-GRF, par exemple, la phosphorylation par Src va activer Rac (Kiyono *et al.*, 2000) alors que celle effectuée par Cdk5 aura pour effet de l'inhiber (Kesavapany *et al.*, 2004). La translocation d'une protéine d'un compartiment à un autre constitue aussi un mode de régulation. Il se trouve que c'est le cas de Net1, un GEF spécifique de RhoA, qui est localisé habituellement dans le noyau et dont la translocation au niveau de la membrane plasmique est corrélée avec l'activation de RhoA (Schmidt and Hall, 2002b). D'autres facteurs d'échange sont dans le même cas, comme Tiam1, GEF-H1,...

II-2-b. Famille CZH (CDM-Zizimin-Homology)

Cette famille de protéines, découverte récemment, a modifié la croyance selon laquelle les protéines contenant des domaines DH étaient les seules à exercer une activité d'échange nucléotidique sur les GTPases Rho. Les membres de la famille CZH ne possèdent pas le domaine DH habituel mais deux domaines CZH (CZH1 et CZH2) (Meller *et al.*, 2005). Les protéines CZH incluent les protéines CDM (Ced-5, Dock180, Myoblast city), qui activent Rac, et les zizimines, qui activent Cdc42. Les protéines CDM sont divisées en deux sous-groupes: Dock4 et Dock180, et il en est de même pour la famille zizimine (figure 33).

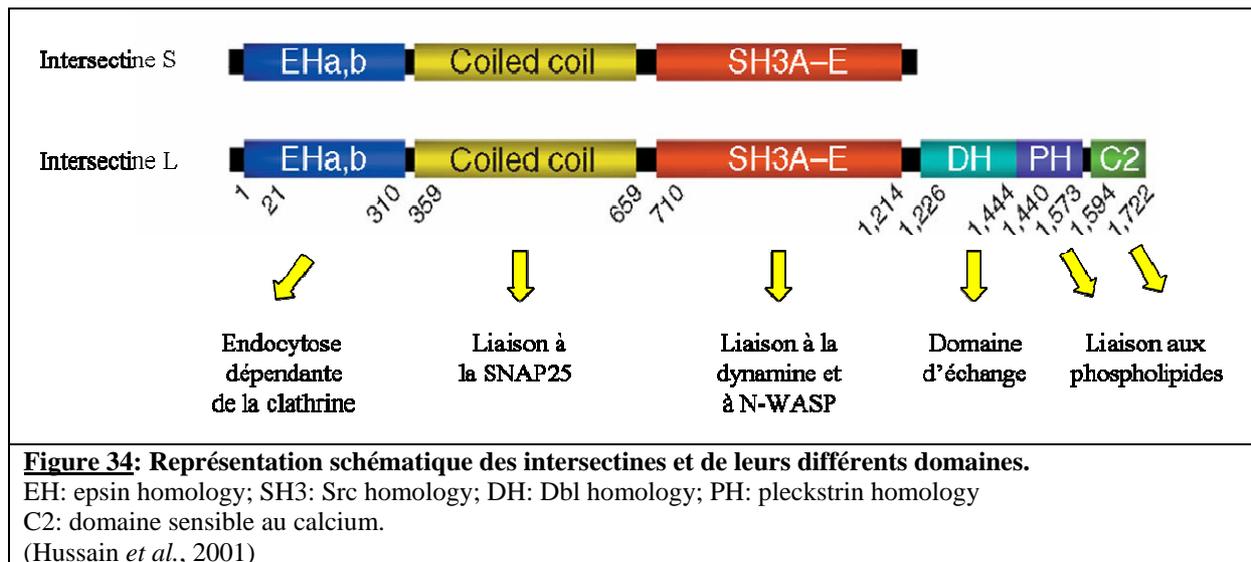


Le domaine CZH2, responsable de l'activité d'échange nucléotidique de la protéine, contient entre 450 et 550 résidus, et il n'y a que 17% d'homologie entre les domaines CZH2 du groupe zizimine et ceux du groupe CDM. Les protéines de la famille zizimine possèdent un domaine PH en N-terminal responsable lui aussi de la localisation membranaire de ces protéines. La zizimine 1 peut former un homodimère via ce domaine CZH2, et des mesures de cinétique ont montré qu'il y avait augmentation de l'affinité pour Cdc42 lorsque les concentrations en Cdc42 étaient élevées, suggérant une coopérativité positive entre les liaisons de Cdc42 aux deux sites (Meller *et al.*, 2004).

II-3. L'intersectine-1L, facteur d'échange de Cdc42 au cours de l'exocytose régulée dans les cellules PC12

II-3-a. Introduction

La mise en évidence des mécanismes de régulation de la dynamique de l'actine par Cdc42 et N-WASP a soulevé plusieurs questions, dont celle du mode d'activation de Cdc42. En effet, le facteur d'échange responsable de l'activation de cette protéine au cours de l'exocytose est inconnu. La mise en évidence du mode d'activation de Cdc42 prenait tout son sens si l'on démontrait au préalable que l'activité de Cdc42 était obligatoirement requise pour le bon déroulement de l'exocytose. Dans ce but, nous avons utilisé une approche de perte de fonction grâce à l'ARN interférence (shRNA pour small hairpin RNA, selon la technique de (McManus and Sharp, 2002)) qui nous a permis de mettre clairement en évidence l'importance de Cdc42. Quant au choix du facteur d'échange à étudier, la famille des GEF est grande, et il existe de nombreux candidats potentiels pouvant interagir avec Cdc42 et l'activer. Le choix d'étudier l'intersectine-L est venu de plusieurs éléments. Tout d'abord, l'intersectine-L est spécifique de Cdc42. Elle a été impliquée dans des phénomènes de trafic membranaire, dont l'endocytose dépendante de la clathrine, elle interagit avec des protéines impliquées dans l'exocytose (SNAP25) et dans l'endocytose (dynamine), et elle est régulée par N-WASP, l'effecteur de Cdc42 au cours de l'exocytose (publication 1). L'intersectine peut être codée par deux gènes, donnant les intersectines 1 et 2, l'intersectine 1 étant retrouvée uniquement dans les neurones et les cellules à dérivée neurale. Ces gènes peuvent subir un épissage alternatif qui donnera deux isoformes de tailles différentes, l'intersectine L (long) et l'intersectine S (short). Seule l'intersectine L est intéressante dans la mesure où elle possède le domaine DH-PH responsable de l'activité d'échange sur Cdc42. Cette protéine présente une structure modulaire semblable à celles de nombreux facteurs d'échange, avec la région C-terminale responsable de l'activité d'échange *via* les domaines DH-PH, ainsi que des domaines EH, coiled coil et SH3 responsables de ses différentes interactions (figure 34).



Ainsi, l'intersectine-L apparaît comme un candidat de choix pour remplir le rôle de facteur d'échange de Cdc42 au cours de l'exocytose. Dans un premier temps, nous avons étudié la présence et la localisation de l'intersectine-L dans les cellules chromaffines et PC12, ce qui nous a permis de détecter cette protéine au niveau des sites d'exocytose. Par la suite, nous avons étudié l'implication potentielle de l'intersectine au cours de l'exocytose. L'approche de perte de fonction avec l'ARN interférence nous a permis d'évaluer le rôle de l'intersectine dans l'activation de Cdc42 et dans l'activité sécrétrice des cellules PC12.

Intersectin-1L nucleotide exchange factor regulates secretory granules exocytosis by activating Cdc42

MALACOMBE M., CERIDONO M, CALCO V., CHASSEROT-GOLAZ S., McPHERERSON P., BADER MF. and GASMAN S.

EMBO Journal, 2006, Vol. 25, Pages 3494-3503

Pages 63 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://www.nature.com/emboj/journal/v25/n15/full/7601247a.html>

La version imprimée de la thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

II-3-c. Conclusion

Nos résultats ont permis de mettre clairement en évidence pour la première fois le rôle de l'intersectine-L en tant que facteur d'échange de Cdc42 au cours d'un processus de sécrétion. Ces données sont particulièrement intéressantes dans la mesure où l'intersectine était à l'origine décrite comme une protéine d'échafaudage impliquée dans l'endocytose dépendante de la clathrine (Hussain *et al.*, 2001). Les expériences de perte de fonction ont démontré l'importance de l'intersectine-L lors de l'exocytose, mais également dans la régulation de l'activation de Cdc42 (pull-down), confirmant ainsi que son rôle au cours de l'exocytose passe bien par la régulation de Cdc42 et non pas par une autre voie. Le fait que l'intersectine-L puisse contrôler l'exocytose et l'endocytose est extrêmement intéressant dans la mesure où ces deux phénomènes pourraient être étroitement couplés dans l'espace et dans le temps dans les cellules neuroendocrines.

On pourrait imaginer que, de par ses fonctions, l'intersectine-L représenterait le lien moléculaire entre l'exocytose et l'endocytose, en mettant en place la machinerie pour les étapes finales de l'exocytose et potentiellement celle nécessaire au début de l'endocytose. L'interaction de l'intersectine avec la SNAP25 pourrait être responsable de sa localisation à la membrane plasmique au niveau des sites d'exocytose, permettant par la suite le recrutement de Cdc42 et de N-WASP. La présence de ces protéines au même endroit est nécessaire à la synthèse de filaments d'actine nécessaire aux étapes terminales de l'exocytose (publication 1), suggérant ainsi un rôle indirect de l'intersectine dans la régulation de la dynamique de l'actine. Toutefois, des zones d'ombre concernant le fonctionnement de l'intersectine subsistent, et les questions touchant son mode de régulation seront discutées au cours de la discussion générale.

Au cours de ce travail, j'ai pris en charge toutes les expériences de biochimie, de sécrétion ainsi que les immunofluorescences concernant l'intersectine. Les parties portant sur l'ARN interférence de Cdc42 et les marquages des sites d'exocytose ont été effectuées par Mara Ceridono.

Quatrième partie:

Discussion générale

Dans cette dernière partie, je voudrais discuter l'ensemble de mes résultats dans le contexte bibliographique actuel. J'ai choisi d'aborder cette discussion générale en trois points. Le premier concerne l'implication des GTPases de type Rho dans les processus d'exocytose. Je traiterai le rôle de Cdc42 dans la cascade responsable de la synthèse d'actine *de novo*, j'émettrai d'autres hypothèses et j'évoquerai également le rôle potentiel de Rac. Dans le deuxième point, je présenterai les différentes hypothèses concernant la fonction des filaments d'actine dont la synthèse est induite par Cdc42. Je discuterai dans cette partie des éventuelles fonctions de ces nouveaux filaments au cours de l'arrimage du granule, de la régulation du pore de fusion ou encore de l'endocytose. Ces notions seront retrouvées également dans la revue en annexe 2. En effet, à la fin de ma thèse, j'ai eu l'occasion d'écrire une revue avec Marie-France Bader et Stéphane Gasman (Malacombe *et al.*, 2006a) dans laquelle nous avons tenté de décrire l'ensemble des rôles possibles de l'actine au cours de la sécrétion neuroendocrine. Je poursuivrai ensuite cette seconde partie en évoquant la situation de l'actine dans les neurones. J'aimerais également montrer à quel point l'amélioration des techniques ultra-structurales est utile dans ce domaine et je terminerai enfin par un rôle possible de régulation de l'actine par les lipides en insistant sur le PIP2. Le troisième point sera consacré aux modes de régulation des GTPases. Je traiterai deux notions concernant les facteurs d'échange: la première concerne la spécificité d'action qu'un GEF peut apporter à la GTPase qu'il active et la seconde présente de quelle façon les GEF peuvent être régulés. Ne voulant pas focaliser uniquement sur l'activation, je ferai également une hypothèse concernant les GAP potentielles de Cdc42 au cours de l'exocytose. Ce troisième point se terminera par l'aspect multi-fonctionnel de l'intersectine qui pourrait aboutir au concept de couplage entre l'exocytose et l'endocytose. D'une façon générale, cette discussion me permettra de prendre un peu de recul par rapport à l'ensemble des données que j'ai pu accumuler pendant ces quelques années de travail, et ceci dans le but d'intégrer au mieux mes résultats dans le contexte bibliographique actuel, d'ouvrir des perspectives mais aussi de souligner les limites de ces données.

I. Implication des GTPases Rho dans les processus d'exo-endocytose

I.1. La cascade Cdc42, N-WASP, Arp2/3 : un lien entre l'actine et l'exocytose ?

J'ai abordé la problématique du rôle de Cdc42 dès mon DEA en 2002. A cette époque, la participation de Cdc42 dans les processus d'exocytose avait été déjà proposée dans les mastocytes (Brown *et al.*, 1998 ; Hong-Geller and Cerione, 2000), dans les cellules β du pancréas (Kowluru *et al.*, 1997) ainsi que chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Adamo *et al.*, 2001). La plupart de ces études ne démontraient aucun mécanisme par lequel Cdc42 pouvait agir. Le remodelage du cytosquelette d'actine y est souvent proposé mais sans être vraiment démontré. Seul les travaux de Hong-Geller et Cerione montraient que Cdc42 agirait non pas sur l'organisation du cytosquelette d'actine mais sur la voie de signalisation menant à l'augmentation de calcium intracellulaire via la synthèse d'inositol 1,4,5 triphosphate (IP3) (Hong-Geller and Cerione, 2000). Sans mettre en doute le rôle de Cdc42 dans la signalisation calcique, il est important de noter que cette étude a été réalisée en sur-exprimant Cdc42 par infection de virus de la vaccine recombinant, un virus connu pour détourner la machinerie de polymérisation de l'actine. De ce fait, il est possible qu'un effet de Cdc42 sur la dynamique du cytosquelette ait été masqué par l'infection virale. En 2002, le groupe de R. Regazzi confirme notre hypothèse en démontrant une participation active de N-WASP au cours de la sécrétion dans les cellules PC12 mais étonnamment, les auteurs proposent un rôle de N-WASP indépendant de Cdc42 (Frantz *et al.*, 2002). C'est sur l'ensemble de cette base bibliographique et en fonction des résultats préliminaires obtenus dans le laboratoire (Gasman *et al.*, 1999) que nous avons cherché à faire le lien entre Cdc42, N-WASP, l'organisation de l'actine et la sécrétion. Nous avons ainsi pu montrer que l'activation de la sécrétion dans les cellules neuroendocrines n'implique pas un simple désassemblage de la barrière d'actine mais plutôt un remodelage précis du réseau d'actine à proximité de la membrane plasmique dans le but d'obtenir les structures nécessaires à l'exocytose. Nos résultats supportent cette notion en proposant une cascade moléculaire aboutissant à la formation *de novo* d'actine au cours de l'exocytose. Cette cascade met en jeu successivement Cdc42 et N-WASP au niveau de la membrane plasmique ainsi que le complexe Arp2/3 localisé sur la membrane granulaire (publication 1). Il est intéressant de noter que des résultats similaires ont été obtenus chez la levure, où une réorganisation du cytosquelette d'actine induite par Cdc42p, Las17p/Bee1p (homologue de N-WASP) et Arp2/3 est nécessaire à la fusion homotypique des vacuoles (Eitzen *et al.*, 2002). De plus, le groupe de T. Galli a montré récemment que Cdc42 régule l'exocytose des vésicules à TI-VAMP au niveau des cônes de croissance par un mécanisme

dépendant de l'actine (Alberts et al., 2006). Enfin, Sokac et collaborateurs ont démontré qu'au cours de l'endocytose compensatrice, Cdc42 et N-WASP étaient responsables de la synthèse *de novo* d'actine au niveau des granules corticaux des ovocytes de xénope (Sokac *et al.*, 2003). Nos résultats s'intègrent donc bien à l'ensemble des données de la littérature, ce qui suggère que le rôle de Cdc42 lors des processus de trafic vésiculaire puisse être conservé entre différents types cellulaires et différents organismes.

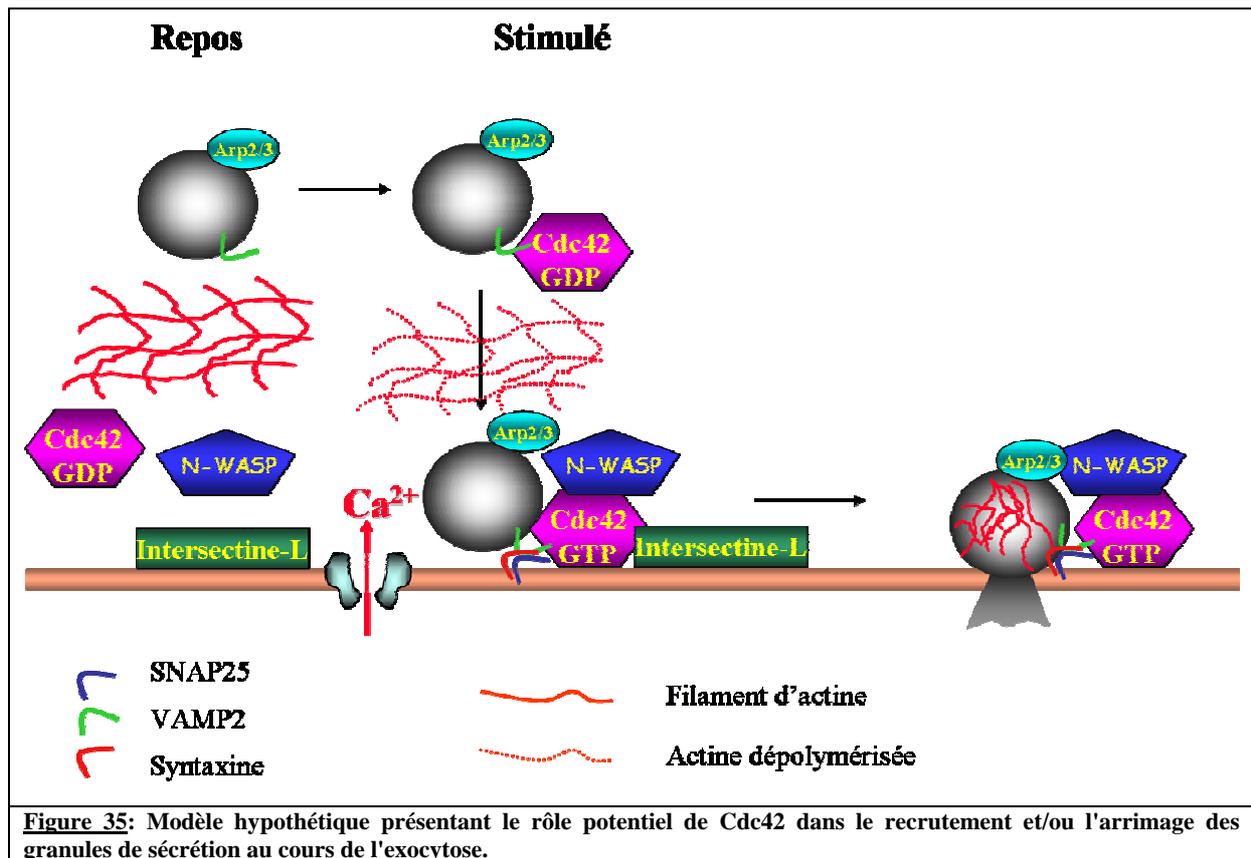
Toutefois, un des points faibles majeurs de notre étude est l'absence de données fonctionnelles sur l'implication du complexe Arp2/3. En effet, nous avons simplement démontré par immunofluorescence une co-localisation partielle entre la sous-unité p34 du complexe Arp2/3 et un marqueur granulaire (la chromogranine B), suggérant l'association d'une partie du complexe Arp2/3 à la membrane du granule. Nous avons alors postulé pour un déplacement du complexe au niveau des sites d'exocytose du fait du recrutement des granules lors d'une stimulation. Il aurait été intéressant de tenter une approche de suppression de fonction par ARN interférence afin de confirmer l'importance de ce complexe dans cette cascade moléculaire. On peut aussi se poser la question du recrutement d'Arp2/3 sur le granule. Bien que l'on retrouve le complexe Arp2/3 au niveau des différentes membranes de divers organelles comme l'appareil de Golgi (Matas *et al.*, 2004), les mitochondries (Fehrenbacher *et al.*, 2005), les endosomes (Southwick *et al.*, 2003) ou encore la membrane plasmique (DeMali *et al.*, 2002; Kovacs *et al.*, 2002), aucune évidence n'a permis de proposer une interaction directe d'Arp2/3 avec les membranes. De façon intéressante, une analyse par protéomique montre la présence de la protéine ArpC4, une autre sous-unité du complexe Arp2/3, sur les vésicules synaptiques (Morciano *et al.*, 2005). Le complexe Arp2/3 semble donc bien être présent sur les vésicules de sécrétion mais la question concernant les mécanismes contrôlant son recrutement reste posée. Dans ce contexte, il est tentant d'imaginer que Arp2/3 puisse se lier au granule, mais aucun facteur pouvant jouer ce rôle n'a été localisé jusqu'à présent sur la membrane d'un granule de sécrétion ou d'une vésicule synaptique. Cependant, il est intéressant de noter que des granules chromaffines purifiés peuvent lier l'actine et déclencher la polymérisation (Bader *et al.*, 1983; Aunis and Perrin, 1984). Ces données suggèrent que la machinerie de nucléation et de polymérisation de l'actine est bel et bien présente sur la membrane des granules.

Nous avons démontré dernièrement que l'inhibition de l'expression de Cdc42 endogène par ARN interférence bloque drastiquement l'activité sécrétrice des cellules PC12

(publication 2). Ces résultats prouvent que l'activité de Cdc42 est absolument requise pour le processus d'exocytose. Une des questions que l'on peut se poser est de savoir si cette forte inhibition de la sécrétion est uniquement la conséquence du blocage de la cascade impliquant N-WASP. Autrement dit, est-ce que Cdc42, une GTPase si importante, ne pourrait pas réguler plusieurs voies effectrices indispensables à l'exocytose? A ce jour, nous ne pouvons exclure une telle hypothèse.

I.2 La GTPase Cdc42 pourrait-elle avoir un rôle dans l'adressage des granules aux sites d'exocytose des cellules neuroendocrines ?

Des études portant sur le rôle de Cdc42 dans la libération d'insuline par les cellules pancréatiques montrent qu'en plus de sa fonction sur l'organisation du cytosquelette (Nevins et Thurmond, 2003), Cdc42 pourrait avoir un rôle d'adressage des granules de sécrétion vers les sites d'exocytose *via* son interaction avec la VAMP2, une protéine vésiculaire du complexe SNARE (Nevins and Thurmond, 2005). Ces résultats permettraient d'expliquer également l'interaction indirecte entre Cdc42 et la syntaxine1 décrite trois ans plus tôt par Daniel et collaborateurs (Daniel et al., 2002). Ce processus d'adressage des granules permettrait à Cdc42 de contrôler la polarisation de la sécrétion. Une telle hypothèse est des plus probables étant donné le rôle central joué par Cdc42 dans l'établissement et le maintien de la polarité au sein de nombreux processus (pour revue, voir Etienne-Manneville, 2004). L'ensemble de nos résultats obtenus dans les cellules chromaffines et PC12 ne nous permet pas de conclure à une éventuelle participation de Cdc42 au recrutement et/ou à l'accostage des granules de sécrétion vers les sites d'exocytose. Cependant, aucun argument ne nous permet vraiment d'exclure complètement cette hypothèse, si ce n'est l'absence de co-localisation entre Cdc42 et la membrane granulaire où se trouve associée VAMP2. D'un autre côté, nous avons démontré que l'intersectine-1L, le facteur d'échange qui stimule Cdc42, est spécifiquement localisé au niveau des sites d'exocytose, suggérant un contrôle spatial étroit de l'activation de Cdc42 au niveau de ces sites (publication 2: (Malacombe *et al.*, 2006b)). Il est alors possible d'imaginer un scénario similaire à celui observé dans les cellules β du pancréas dans lequel Cdc42, une fois localisée au niveau des sites d'exocytose *via* l'intersectine-1L, servirait de point de reconnaissance pour les granules par le biais d'une éventuelle interaction avec la VAMP2 avant d'exercer son action sur le cytosquelette (figure 35).



L'interaction entre VAMP2 et Cdc42 pourrait facilement être étudiée par immunoprécipitation. De plus, une analyse par microscopie électronique de la distribution des granules devrait nous apporter quelques éléments de réponse quant à cette hypothèse. En effet, si Cdc42 joue un rôle dans l'accostage/arrimage des granules au niveau des sites d'exocytose, la quantité de granules arrimés devrait drastiquement chuter dans les cellules dont l'expression de Cdc42 a été bloquée par ARN interférence. Une fois activée, Cdc42 pourrait alors exercer son action sur le remodelage de l'actine en stimulant la cascade N-WASP qui va permettre la repolymérisation d'actine. Une des grandes questions qui reste à examiner concerne le rôle exact de ces structures d'actine au niveau des sites d'exocytose.

I.3. Cdc42 et annexine 2 : une relation potentielle ?

Une des molécules pouvant potentiellement participer à la régulation de l'organisation des filaments d'actine induits par Cdc42 est l'annexine 2.

Les annexines sont des protéines ubiquitaires qui sont régulées par le calcium et qui ont la propriété de se lier aux phospholipides membranaires avec une haute affinité ainsi que d'interagir avec le cytosquelette d'actine (Hayes *et al.*, 2004; Gerke *et al.*, 2005). Ces protéines ont été proposées comme des régulateurs importants des interactions membrane-

membrane et membrane-cytosquelette. Ainsi, on retrouve souvent l'intervention des annexines dans des processus de trafic membranaire tels que l'exocytose, l'endocytose ou encore la phagocytose. Cette famille de protéines régule également la stabilisation de micro-domaines membranaires, que ce soit au niveau d'organelles ou de la membrane plasmique.

Parmi les membres de cette famille, l'annexine 2 présente un intérêt tout particulier dans le cadre de notre étude. En effet, il a été montré dans plusieurs processus cellulaires que l'annexine 2 est capable de coordonner l'organisation du cytosquelette d'actine avec la dynamique membranaire. Elle est notamment capable d'interagir avec les domaines membranaires enrichis en PIP₂, avec lesquels les filaments d'actine entrent en contact. Par exemple, l'annexine 2 est un composant des comètes d'actine qui propulsent les vésicules d'endocytose (Merrifield *et al.*, 2001). De plus, elle intervient dans de nombreux autres processus de trafic membranaire comme le transport apical dans les cellules épithéliales (Jacob *et al.*, 2004), la translocation des vésicules contenant le transporteur du glucose (GLUT-4) dans les adipocytes (Huang *et al.*, 2004), l'endocytose des récepteurs membranaires (Zobiack *et al.*, 2003) mais également l'exocytose régulée. En effet, le travail de Sylvette Chasserot-Golaz dans notre laboratoire montre que l'annexine 2 joue un rôle important au cours de la sécrétion dans les cellules chromaffines. En injectant un peptide qui empêche la phosphorylation de l'annexine 2 et par conséquent sa translocation en périphérie cellulaire, elle a mis en évidence une diminution de la sécrétion de catécholamines, suggérant la nécessité de la présence de cette protéine à la membrane plasmique lors de l'exocytose (Chasserot-Golaz *et al.*, 1996). Par la suite, l'importance fonctionnelle de l'annexine a été confirmée en montrant que la déplétion de l'annexine 2 endogène inhibe de façon importante l'activité sécrétrice des cellules chromaffines (Chasserot-Golaz *et al.*, 2005). Dans cette même étude, les auteurs proposent que l'annexine 2 régule la mise en place de radeaux lipidiques nécessaires à l'organisation spatiale, structurale et temporelle des protéines de l'exocytose. Il semble donc évident que l'annexine 2 et sa translocation en périphérie cellulaire soient importantes au cours de l'exocytose, sans pour autant que les détails du mécanisme d'action soient connus.

De façon intéressante, le groupe de Keith Mostov montre que l'annexine 2 joue un rôle clé dans la morphogenèse des cellules épithéliales en kyste creux en recrutant la GTPase Cdc42 au pôle apical des cellules, entraînant ainsi une réorganisation du cytosquelette d'actine (Martin-Belmonte *et al.*, 2006). Selon les auteurs, l'interaction annexine 2/Cdc42 ne serait pas directe. Au vu de ces données, il serait fort intéressant de mettre en évidence un lien

fonctionnel entre Cdc42 et l'annexine 2 au cours de l'exocytose dans les cellules neuroendocrines. Une expérience simple serait de réaliser une invalidation génique de l'annexine 2 et d'étudier si Cdc42 est toujours efficacement recrutée au niveau des sites d'exocytose et si elle est encore capable de stimuler l'activité sécrétrice des cellules.

Mais malgré tout, une question reste toujours en suspend. Quelle pourrait être la fonction première d'une telle relation entre Cdc42 et l'annexine 2 ? Une étude très intéressante a récemment montré que l'annexine 2 se comporte vis-à-vis des filaments d'actine comme une protéine de « coiffe » (capping protein). De plus, elle pourrait aussi être capable de bloquer la polymérisation en interagissant avec l'actine monomérique (actine G) permettant ainsi de séquestrer les monomères (Hayes *et al.*, 2006). On pourrait donc aisément imaginer un scénario où l'annexine 2 assurerait l'apport de monomères d'actine au niveau des sites d'exocytose. Un tel apport pourrait permettre l'approvisionnement de la cascade Cdc42, N-WASP, Arp2/3 en actine G afin d'assurer la repolymérisation rapide dans les phases tardives de l'exocytose. Bien entendu, une telle hypothèse reste à démontrer expérimentalement.

I.4. Et Rac dans tout cela ?

Les GTPases de type Rho les plus étudiées sont RhoA, Rac1 et Cdc42 et il n'est pas rare de les voir intervenir toutes les trois dans la régulation d'un même processus. Bien que ce ne soit de loin pas général, il arrive que la fonction de RhoA antagonise celles de Rac1 et Cdc42 qui, elles deux, ont tendance à fonctionner dans le même but. Par exemple, le groupe de Collard a montré au cours de la migration des fibroblastes que l'activité de RhoA pouvait être inhibée par celles de Rac et de Cdc42 (Sander *et al.*, 1999), suggérant ainsi que RhoA ne puisse être active en même temps que les deux autres protéines. De façon générale, RhoA gère les structures de type contractiles (acto-myosine), est responsable de la formation des fibres de stress et favorise la stabilisation des filaments d'actine, alors que Cdc42 contrôle la formation des filopodes et Rac1 celle des lamellipodes (Raftopoulou and Hall, 2004).

Dans les cellules neuroendocrines, Stéphane Gasman a montré en 1997 que RhoA est impliquée dans le maintien de la barrière corticale d'actine, suggérant plutôt un rôle de "frein" pour cette protéine au cours de l'exocytose (Gasman *et al.*, 1997). Par la suite, nos travaux ont démontré l'implication positive de Cdc42 et son importance au cours des étapes finales de la sécrétion (publications 1 et 2). Sachant de quelle façon RhoA et Cdc42 sont impliquées, on peut donc se poser la question de savoir ce qu'il en est de Rac dans le contexte de l'exocytose?

Plusieurs études ont impliqué Rac dans les phénomènes de trafic membranaire. Des études ont proposé des rôles dans la pinocytose (West *et al.*, 2000), la phagocytose (Massol *et*

al., 1998), et le groupe de Cerione a montré un rôle positif de Rac dans la dégranulation des mastocytes (Hong-Geller and Cerione, 2000). Dans les neurones, des travaux réalisés chez l'aplysie ont mis en évidence l'importance de Rac au cours des étapes tardives de la neurotransmission (Doussau *et al.*, 2000; Humeau *et al.*, 2002). En 2000, grâce l'utilisation de toxines ciblant spécifiquement cette GTPase, Doussau et collaborateurs ont montré que la libération de neurotransmetteurs était touchée et ont suggéré l'implication de Rac dans les dernières phases de l'exocytose (Doussau *et al.*, 2000). Dans les cellules chromaffines, le rôle positif de Rac dans la sécrétion de catécholamines a déjà été proposé (Li *et al.*, 2003b), et nous avons récemment confirmé au laboratoire l'importance de Rac sur l'activité des cellules PC12 par approche ARN interférence (Fanny Momboisse et Stéphane Gasman, communication personnelle). Toutefois, les voies activatrice et effectrice de cette GTPase sont encore inconnues mais sont actuellement à l'étude.

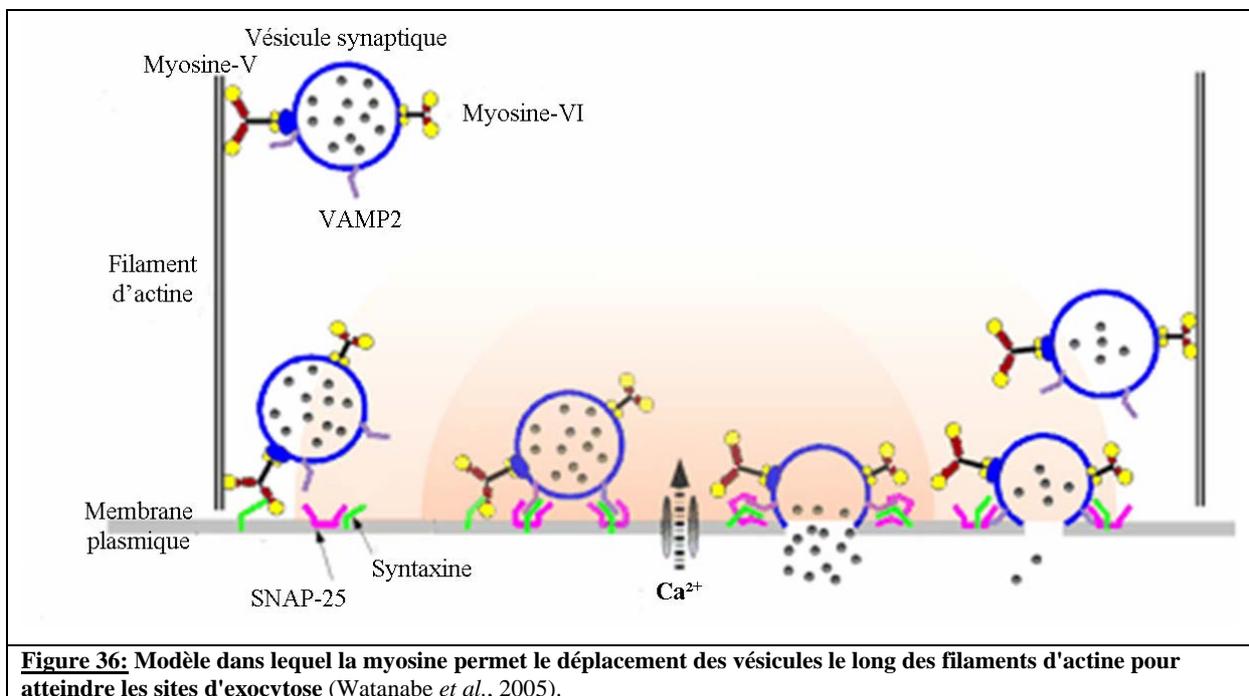
II. Quelles fonctions pour les filaments d'actine néo-synthétisés via l'activation de Cdc42 ? (Malacombe *et al.*, 2006a)

Dans le modèle que nous proposons, le complexe Arp2/3 est amené par les granules de sécrétion au niveau des sites d'exocytose. Ainsi, l'interaction entre N-WASP, les monomères d'actine et Arp2/3 ne serait possible qu'au niveau des sites d'arrimage des granules, permettant ainsi un contrôle spatial et temporel de la polymérisation de l'actine, à l'interface entre le granule et la membrane plasmique (voir publication 1 et figure 35). Ce rôle inédit et séduisant de l'actine soulève deux grandes questions : i) quelles peuvent être leurs fonctions exactes dans les phases tardives de l'exocytose ? et ii) comment sont organisés ces nouveaux filaments?

II.1 Rôle de l'actine dans l'arrimage du granule au site d'exocytose

Il a été suggéré que l'actine puisse participer au recrutement et/ou à l'arrimage du granule au niveau de son site d'exocytose (Watanabe *et al.*, 2005). En effet, la myosine V, associée indirectement à la membrane granulaire, est responsable du transport des granules sur l'actine. Les auteurs proposent qu'une fois le granule arrimé à la membrane plasmique, la myosine V interagisse directement avec la syntaxine 1A (figure 36). Dans ce modèle, les filaments d'actine assurent l'acheminement du granule vers la membrane plasmique, et il ne peut donc s'agir dans ce cas des filaments d'actine néo-synthétisés suite à l'activation de

Cdc42. Cependant, on pourrait imaginer qu'une fois polymérisés, ces nouveaux filaments interagissent également avec la myosine V. Le mouvement de la myosine V granulaire sur ces filaments pourrait alors engendrer une force permettant le rapprochement final de la membrane granulaire vers la membrane plasmique, étape préalable à la fusion. Cette hypothèse n'est que pure spéculation, cependant il est intéressant de noter que des expériences menées *in vitro* ont mis en évidence la dépendance de la myosine V au calcium, l'élément déclencheur de l'exocytose. En effet, le calcium agit sur la conformation de la myosine et sur sa liaison à la calmoduline, et l'activité de la myosine est régulée par ces deux facteurs (Nguyen and Higuchi, 2005; Lu *et al.*, 2006).



Sachant que la polymérisation d'actine au niveau des sites d'exocytose nécessite l'interaction entre Cdc42, N-WASP, le complexe Arp2/3 granulaire et l'actine, il est évident que le granule est déjà très proche de la membrane plasmique. En conséquence, notre hypothèse quant au rôle des filaments d'actine néo-synthétisés pencherait plutôt pour les étapes plus terminales de l'exocytose, en aval de l'arrimage.

II.2. Un rôle potentiel de l'actine dans les phases finales de l'exocytose

A l'heure actuelle, aucune évidence ne permet de proposer un rôle de l'actine dans la fusion membranaire entre un granule de sécrétion et la membrane plasmique. Cependant, un parallèle intéressant peut être fait avec les récents travaux sur la fusion homotypique de

vacuoles chez la levure. Tout comme l'exocytose, la fusion vacuolaire se compose en trois étapes principales, à savoir, l'arrimage (docking), la préparation à la fusion (priming), et la fusion *per se*. De façon intéressante, il a été montré dans ce processus que l'arrimage nécessite une dépolymérisation de l'actine tandis que la fusion proprement dite requiert une repolymérisation des filaments d'actine (Eitzen et al., 2001). Cette dynamique de l'actine a été confirmée deux ans plus tard par Wang et collaborateurs, qui ont démontré que dans un premier temps, l'actine présente sur les vacuoles est désassemblée sous l'action de Ypt7p, une GTPase de la famille Rab. Cette GTPase est responsable de la formation de l'anneau d'arrimage qui représente le point de contact entre les vacuoles. Les v- et t-SNARE peuvent s'assembler au niveau de cet anneau, et l'actine G s'y accumule aussi. Toute la machinerie étant mise en place, l'actine peut être repolymérisée pour l'étape finale et ainsi permettre la fusion (Wang *et al.*, 2003b). L'actine dans les phénomènes de fusion a aussi été abordée *in vitro* par l'équipe de Gareth Griffiths. Ce groupe a montré que des organelles tels que les phagosomes et les endosomes peuvent fusionner entre eux, et que pour cela ils nécessitent la présence d'actine néo-synthétisée à leur surface (Kjeken *et al.*, 2004). Cette formation d'actine serait dépendante de la liaison de l'actine à l'ezrine, et les phosphoinositides tels que le PIP2 en contrôleraient la régulation (Defacque *et al.*, 2000; Defacque *et al.*, 2002). Toutefois, ces données sont obtenues *in vitro* à partir de préparations d'organelles et il ne faut pas oublier que de nombreux autres éléments doivent être pris en compte *in vivo*.

Toujours dans le contexte de la fusion, on peut aussi se pencher sur la question de la régulation de la dynamique d'ouverture et de fermeture du pore de fusion, où un rôle de l'actine serait une hypothèse fort intéressante. Le groupe de Jena a mené des études utilisant la microscopie à force atomique sur des cellules des acini pancréatiques. A la surface de ces cellules, ils ont montré la présence de dépressions qui changent de diamètre lorsque la sécrétion est déclenchée, suggérant que ces dites dépressions correspondent à des pores de fusion. Il serait intéressant d'étudier l'effet des mutants dominants négatifs et positifs de Cdc42 et N-WASP sur la morphologie et la dynamique de ces dépressions. Enfin, ces mêmes mutants pourraient servir au cours d'expériences d'ampérométrie afin d'étudier le rôle de l'actine néo-synthétisée dans la dynamique du pore de fusion à l'instar des travaux de l'équipe d'Artalejo, qui montrent une variation de la libération de catécholamines en fonction de l'ouverture du pore de fusion (Elhamdani *et al.*, 2001).

Une hypothèse intéressante et encore inédite dans les cellules neuroendocrines serait un rôle de l'actine dans l'expulsion du contenu granulaire. Dans certains types cellulaires,

l'actine a été décrite comme pouvant compresser les granules en cours d'exocytose et fournir ainsi la force nécessaire au granule pour expulser son contenu dans le milieu extracellulaire. Par exemple, Sokac et collaborateurs ont observé une polymérisation massive d'actine à la surface des granules corticaux qui avaient fusionné avec la membrane plasmique dans les œufs de xénope (Sokac *et al.*, 2003). De même, dans les cellules pancréatiques, les granules en train de libérer le zymogène sont recouverts d'un manteau d'actine (Thurmond *et al.*, 2003; Nemoto *et al.*, 2004). Dans l'ensemble, ces observations ont suggéré que la fusion déclencherait la mise en place d'actine autour des granules en cours d'exocytose, et que le rôle de ces filaments serait d'aider à l'expulsion du contenu granulaire. Le nom donné à ce phénomène est "kiss and coat" (Sokac and Bement, 2006), et il semble jouer un rôle important dans les cellules qui libèrent lentement le contenu de leur granule du fait de la densité ou de l'insolubilité des protéines de la matrice granulaire.

Le système actine-myosine serait lui aussi intéressant en tant qu'initiateur de force aidant à l'expulsion du contenu granulaire. Il a été proposé par Segawa et collaborateurs dans les glandes parotides de rat (Segawa and Yamashina, 1989), et les travaux de l'équipe de Gutierrez en 2004 ont proposé la myosine II comme intervenant au cours de la fusion. En effet, en infectant des cellules chromaffines avec des mutants non phosphorylables de la myosine II, ils ont pu mesurer par ampérométrie la modification des caractéristiques des phases rapides de libération, suggérant ainsi l'implication de cette protéine dans la fusion (Neco *et al.*, 2004). La même équipe ayant démontré l'association du réseau d'actine et de la myosine II (Neco *et al.*, 2002), il semblerait plausible que la myosine II exerce une force contractile via les filaments d'actine. La pression engendrée jouerait alors sur la tension membranaire et pourrait ainsi agir sur l'expulsion du contenu granulaire.

II-3. Implication des filaments d'actine au cours de l'endocytose

L'endocytose est également un phénomène qui pourrait être sujet à la régulation par les filaments d'actine. L'endocytose compensatrice permet la recapture des membranes granulaires faisant suite à la fusion. Ce processus est indispensable à l'intégrité des cellules sécrétrices et assure le recyclage ou la dégradation de la membrane granulaire. Dans les cellules neuroendocrines, les mécanismes moléculaires régulant l'endocytose compensatrice des granules de sécrétion sont peu étudiés. Seul le groupe de Zorec a suggéré un rôle du cytosquelette d'actine dans la formation des vésicules d'endocytose dans les cellules mélanotropes de rat (Chowdhury *et al.*, 2002).

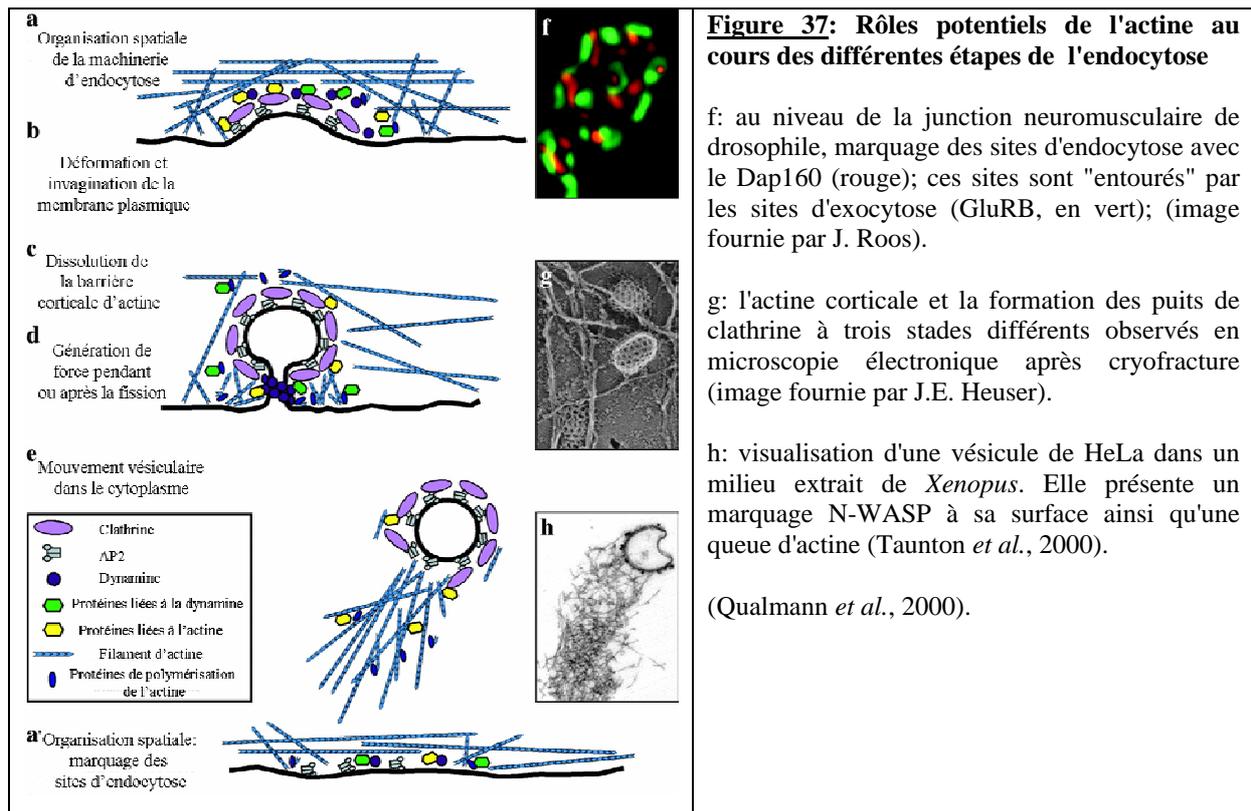


Figure 37: Rôles potentiels de l'actine au cours des différentes étapes de l'endocytose

f: au niveau de la jonction neuromusculaire de drosophile, marquage des sites d'endocytose avec le Dap160 (rouge); ces sites sont "entourés" par les sites d'exocytose (GluRB, en vert); (image fournie par J. Roos).

g: l'actine corticale et la formation des puits de clathrine à trois stades différents observés en microscopie électronique après cryofracture (image fournie par J.E. Heuser).

h: visualisation d'une vésicule de HeLa dans un milieu extrait de *Xenopus*. Elle présente un marquage N-WASP à sa surface ainsi qu'une queue d'actine (Taunton *et al.*, 2000).

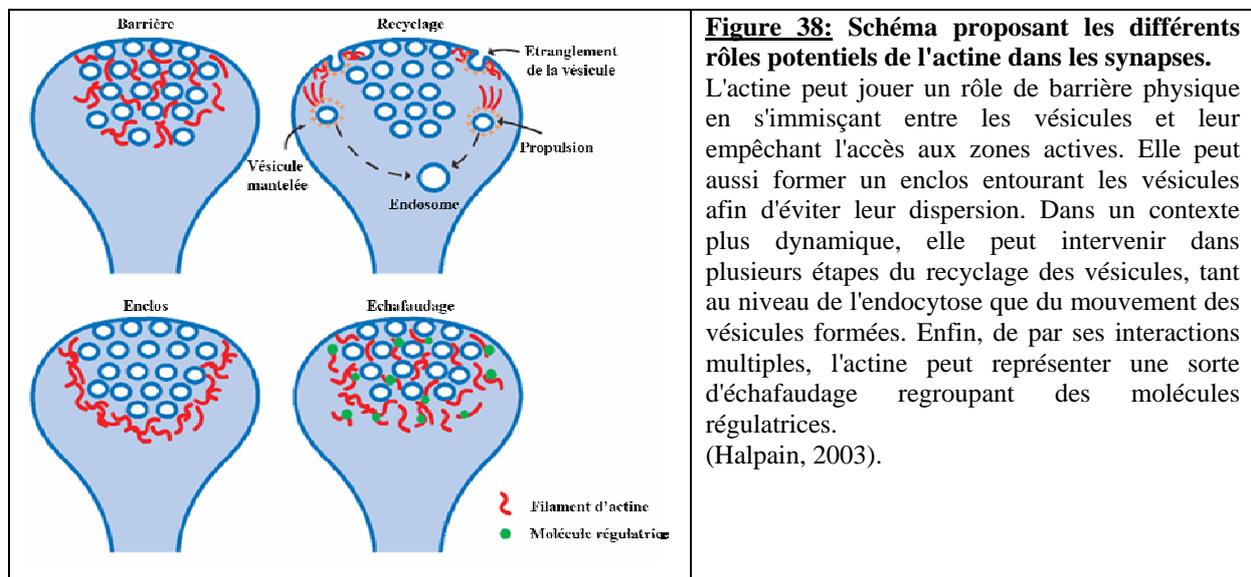
(Qualmann *et al.*, 2000).

Cette hypothèse semble des plus probables car de nombreuses données obtenues dans divers types cellulaires indiquent que l'actine intervient au cours de ce processus. Par exemple, les travaux d'Apodaca et collaborateurs ont montré que l'actine joue un rôle important au cours de l'endocytose dans les cellules polarisées (Apodaca, 2001), et elle a aussi été impliquée dans l'endocytose dépendante de la clathrine dans les cellules lacrymales (Da Costa *et al.*, 2003). Dans les fibroblastes, il a été démontré qu'il y avait une mise en place d'actine au niveau des puits recouverts de clathrine lors de l'endocytose selon un processus qui impliquerait N-WASP et Arp2/3 (Merrifield *et al.*, 2004; Merrifield *et al.*, 2005) (voir figure 37). Les filaments d'actine décrits par Sokac et collaborateurs au cours du "kiss and coat" sont aussi impliqués dans l'endocytose compensatrice dans les ovocytes de xénope (Sokac *et al.*, 2003). Dans un tel contexte, l'implication des filaments d'actine au cours de la recapture des granules mérite d'être explorée. A l'heure actuelle, au laboratoire, le groupe de Stéphane Gasman tente de mettre au point un test spécifique permettant de mesurer cette endocytose du granule après exocytose.

II.4 Actine, Rho et exocytose : quelle est la situation dans les neurones ?

Le rôle de l'actine au cours de la transmission synaptique est un domaine depuis longtemps abordé mais qui est toujours sujet à débat, et aujourd'hui plus que jamais. Si l'on

tente de faire un bilan de la littérature à ce propos, on se rend vite compte que non seulement l'actine semble intervenir dans chaque étape du cycle des vésicules synaptiques (compartmentalisation des vésicules, recrutement, fusion et recyclage) mais qu'en plus son rôle varie énormément en fonction du type de synapse et du stade de développement, rendant les interprétations encore plus délicates. Durant ces six dernières années, deux groupes de recherche ont courageusement relevé le défi d'établir une synthèse concernant l'implication de l'actine dans la neurotransmission, donnant ainsi naissance à deux excellentes revues (Doussau and Augustine, 2000; Dillon and Goda, 2005). J'aimerais simplement essayer dans ce paragraphe de faire un parallèle entre mes résultats et les données connues dans les neurones. J'en profiterai pour décrire les quelques modèles principaux proposés dans ces cellules (figure 38).



Contrairement aux cellules neuroendocrines dans lesquelles l'actine forme un réseau cortical dense et net, il est difficile de définir une organisation unique de l'actine dans les neurones. En effet, les premières expériences de cryofracture sur la jonction neuromusculaire de grenouille, les cellules du cervelet ou encore l'organe électrique de la raie ont montré un réseau dense et varié de microfilaments présents dans toute la terminaison et interconnecté aux vésicules synaptiques (Landis *et al.*, 1988; Hirokawa *et al.*, 1989). De plus, dans les neurones, on retrouve plusieurs types d'organisation des filaments d'actine. On peut en observer des plutôt courts (30 nm), associés aux vésicules synaptiques et à la synapsine I (Hirokawa *et al.*, 1989), ou d'autres beaucoup plus longs, distribués dans toute la terminaison

pré-synaptique et souvent associés aux filaments courts (Landis and Reese, 1983). Toutefois, il ne faut pas généraliser ce type d'organisation à l'ensemble des neurones dans la mesure où encore une fois des variations importantes apparaissent en fonction du type cellulaire.

A l'instar des cellules neuroendocrines, l'actine a aussi été décrite comme une barrière séparant les vésicules de réserve de celles qui sont prêtes à fusionner. Une étude particulièrement complète effectuée par Sankaranarayanan et collaborateurs apporte de nombreux renseignements concernant le rôle de l'actine dans les neurones d'hippocampe de rat (Sankaranarayanan *et al.*, 2003). Dans un premier temps, ils ont mis en évidence la présence d'actine autour de la population de réserve, formant une sorte de filet qui retient les vésicules et qui correspondrait fonctionnellement à la barrière physique décrite dans les cellules neuroendocrines. Ils montrent que l'actine joue aussi un rôle de stabilisateur *via* son interaction avec les synapsines, qui réticulent les filaments entre eux. Ces résultats présentent donc l'actine comme une barrière empêchant l'accès des vésicules à la zone active et leur dispersion. Par la suite, en sur-exprimant l'actine-GFP dans ces neurones, les auteurs ont constaté que la stimulation électrique provoquait non seulement le déplacement de l'actine vers les zones actives mais aussi l'augmentation du taux de polymérisation de l'actine. Cette observation est particulièrement intéressante dans la mesure où elle démontre un phénomène de polymérisation d'actine en périphérie cellulaire suite à une stimulation, tout comme l'activation de la cascade mise en évidence dans les cellules PC12 (publication 1). Ces résultats constituent donc une preuve supplémentaire du rôle positif de l'actine.

Plutôt que d'inhiber la mobilité des vésicules, l'actine pourrait tout aussi bien promouvoir leurs mouvements de façon active. A la fin des années 90, deux études avaient montré *in vitro* que la myosine V pouvait servir de moteur moléculaire pour le déplacement des vésicules le long des filaments d'actine (Prekeris and Terrian, 1997; Evans *et al.*, 1998). Les travaux de Sakaba et collaborateurs sur la synapse du calice de Held ont confirmé ces résultats en mettant en évidence que le recrutement des vésicules nécessitait la polymérisation d'actine (Sakaba and Neher, 2003). Donc encore une fois ici, on retrouve un parallèle intéressant avec les cellules neuroendocrines où la myosine V a été proposée dans le mouvement des granules.

L'actine est donc également présente au niveau de la zone active, site d'exocytose dans les neurones, mais la question est de savoir si elle joue un rôle actif au cours de la libération

de neurotransmetteurs, et si oui, de quelle façon? Une étude menée par Morales (Morales *et al.*, 2000) a mis en évidence que le traitement des neurones à la latrunculine A stimule la libération de neurotransmetteur, résultat confirmé par Sankaranarayanan (Sankaranarayanan *et al.*, 2003), alors que les travaux de Kim et collaborateurs avaient montré que l'application de drogues dépolymérisant l'actine provoquait une diminution de la neurotransmission (Kim and Lisman, 1999). La question du rôle de l'actine au cours de l'exocytose reste donc ouverte.

Enfin, plusieurs données indiquent une implication de l'actine au cours du recyclage des vésicules synaptiques. Le modèle le plus étudié dans ce cas est la synapse de lamproie. En effet, lors d'une stimulation importante, de nouveaux filaments d'actine apparaissent au niveau de la zone d'endocytose. Ces nouveaux filaments sont associés aux vésicules recouvertes de clathrine, et l'utilisation de drogues dépolymérisant l'actine a montré l'accumulation de puits inachevés au niveau de la membrane plasmique, suggérant un rôle de l'actine dans la maturation des puits recouverts de clathrine (Shupliakov *et al.*, 2002; Bloom *et al.*, 2003; Bourne *et al.*, 2006). Une fois que l'endocytose a eu lieu et que les vésicules sont détachées de la membrane plasmique, leur déplacement nécessite une force de propulsion qui pourrait être fournie par l'actine sous forme de comètes à l'instar de celles utilisées par *Listeria*, comme cela a été suggéré par les travaux de Shupliakov (Shupliakov *et al.*, 2002). Une étude de Kessels en 2002 dans les neurones de l'hippocampe montre qu'une cascade moléculaire impliquant les syndapines et N-WASP est responsable de la formation d'actine au cours de l'endocytose des récepteurs dépendante de la clathrine et contrôlée par la dynamine. Les auteurs concluent que ce mécanisme pourrait potentiellement être employé pour la formation des vésicules d'endocytose (Kessels and Qualmann, 2002). Une hypothèse d'un rôle de l'actine est donc tout aussi envisageable dans les neurones que dans les cellules neuroendocrines.

Le rôle des GTPases Rho au cours de l'exocytose dans les cellules neuroendocrines a été le sujet de nombreux travaux, et il serait intéressant d'étudier l'implication de ces protéines dans la neurotransmission. Bien que le rôle des GTPases Rho ait été décrit dans la synaptogenèse et la croissance neuritique, il faut noter que très peu de données sur l'action des Rho dans la neurotransmission *per se* sont publiées. Une des seules, sinon la seule démonstration qui ait été faite est celle réalisée dans notre département, sur les neurones d'aplysie, où il a été montré que Rac1 est impliquée dans le contrôle des étapes tardives de l'exocytose (Doussau *et al.*, 2000; Humeau *et al.*, 2002).

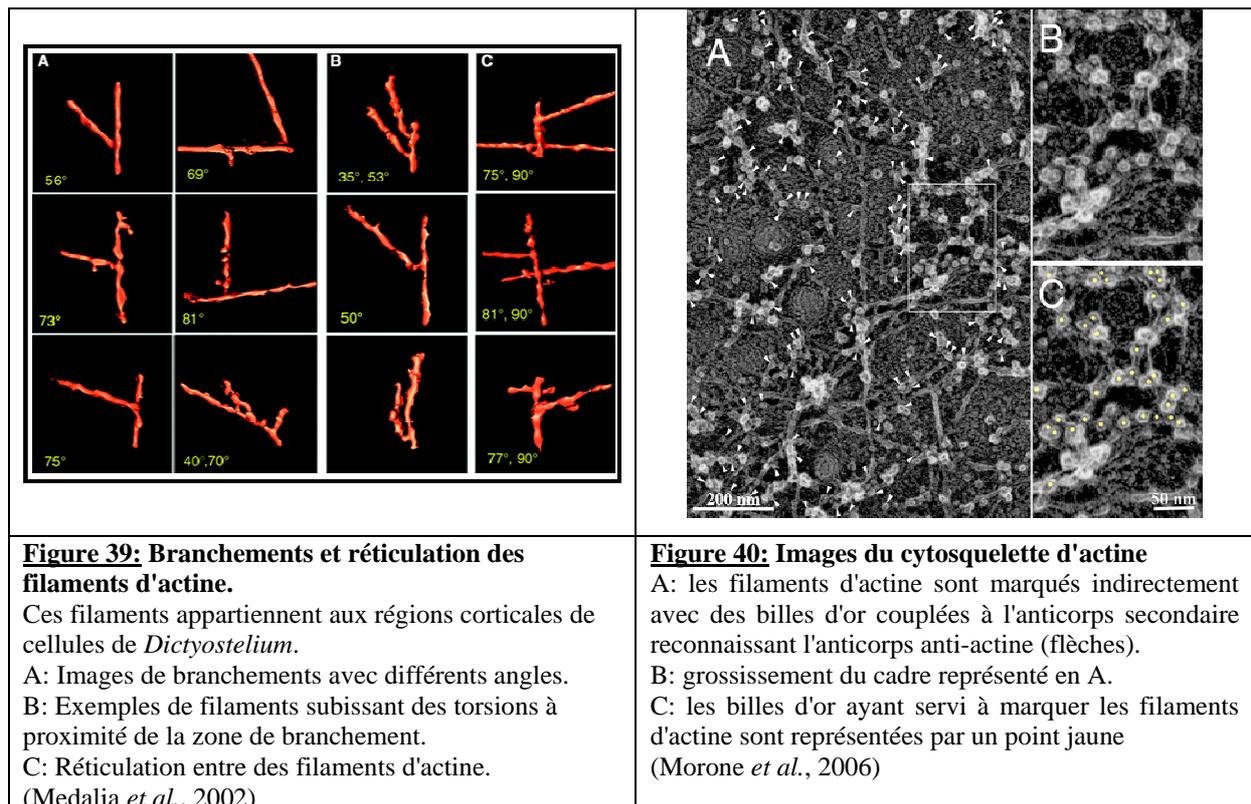
II.5 L'actine dans les cellules neurosécrétrices : existe-t-il une relation entre son organisation et sa fonction ?

Globalement, l'actine semble être impliquée au cours de la plupart des étapes de l'exocytose, tant dans les neurones que dans les cellules neuroendocrines. Une question importante découle de cette observation: la cellule adapte-t-elle l'organisation de ses filaments d'actine en fonction du rôle qu'ils doivent jouer ? Autrement dit, dans une cellule neuroendocrine, existe-t-il une différence entre la barrière d'actine corticale, les filaments permettant l'acheminement du granule vers la membrane plasmique et l'actine-F polymérisée *de novo* au niveau des sites d'exocytose? Il est fort probable que oui mais peu de données ultrastructurales sont disponibles aujourd'hui.

Les différences peuvent se poser en terme de taille de filaments, d'organisation dans l'espace, de la présence ou pas de branchements, etc... En 1989, l'équipe de Trifaro a effectué une étude ultrastructurale par microscopie électronique dans les cellules chromaffines et a montré qu'il y avait des modifications notables de l'organisation de l'actine en fonction de l'état de stimulation de la cellule (Tchakarov *et al.*, 1998). En effet, dans les cellules au repos, le cytosquelette est réparti régulièrement sous la membrane plasmique alors que dans les cellules stimulées, une déstructuration partielle du réseau est observée. Cette observation ne fait que refléter une des premières étapes de la dynamique de l'actine: la déstructuration de la barrière. Malheureusement, il n'existe pas à l'heure actuelle de données ultrastructurales qui pourraient confirmer l'existence de filaments à l'interface entre les granules et les sites d'exocytose. Les seuls éléments en faveur d'une telle hypothèse viennent d'une démonstration biochimique de la présence d'actine sur la membrane granulaire en 1983 (Bader and Aunis, 1983) et d'une étude menée en 1989 par Senda et collaborateurs qui ont montré la présence de microfilaments sur les granules en utilisant la cryofracture en microscopie électronique (Senda *et al.*, 1989).

La localisation précise au niveau des sites d'exocytose des filaments d'actine induits par la voie moléculaire de Cdc42 laisse à penser que ces filaments sont probablement de petite envergure avec une organisation fine et précise. En conséquence, les chances d'observer avec précision leur organisation par le biais des techniques classiques d'observation comme la fluorescence (phalloïdine couplée à un fluorophore) ou même la microscopie électronique en deux dimensions sont faibles. L'amélioration des techniques de microscopie électronique et de fixation a permis récemment de développer une technique particulièrement intéressante : la tomographie électronique. Cette technique est basée sur l'acquisition en microscopie

électronique d'une série d'inclinaisons d'un objet biologique. La combinaison de ces images permet alors d'obtenir une reconstitution tridimensionnelle des volumes d'organelles ou de filaments subcellulaires. De façon intéressante, cette technique a été appliquée avec succès pour mettre en évidence l'organisation des filaments d'actine dans des fibroblastes (Morone *et al.*, 2006) et des cellules de l'amibe *Dictyostelium* (Medalia *et al.*, 2002). Les exemples des résultats que l'on peut obtenir sont illustrés dans les figures 39 et 40.

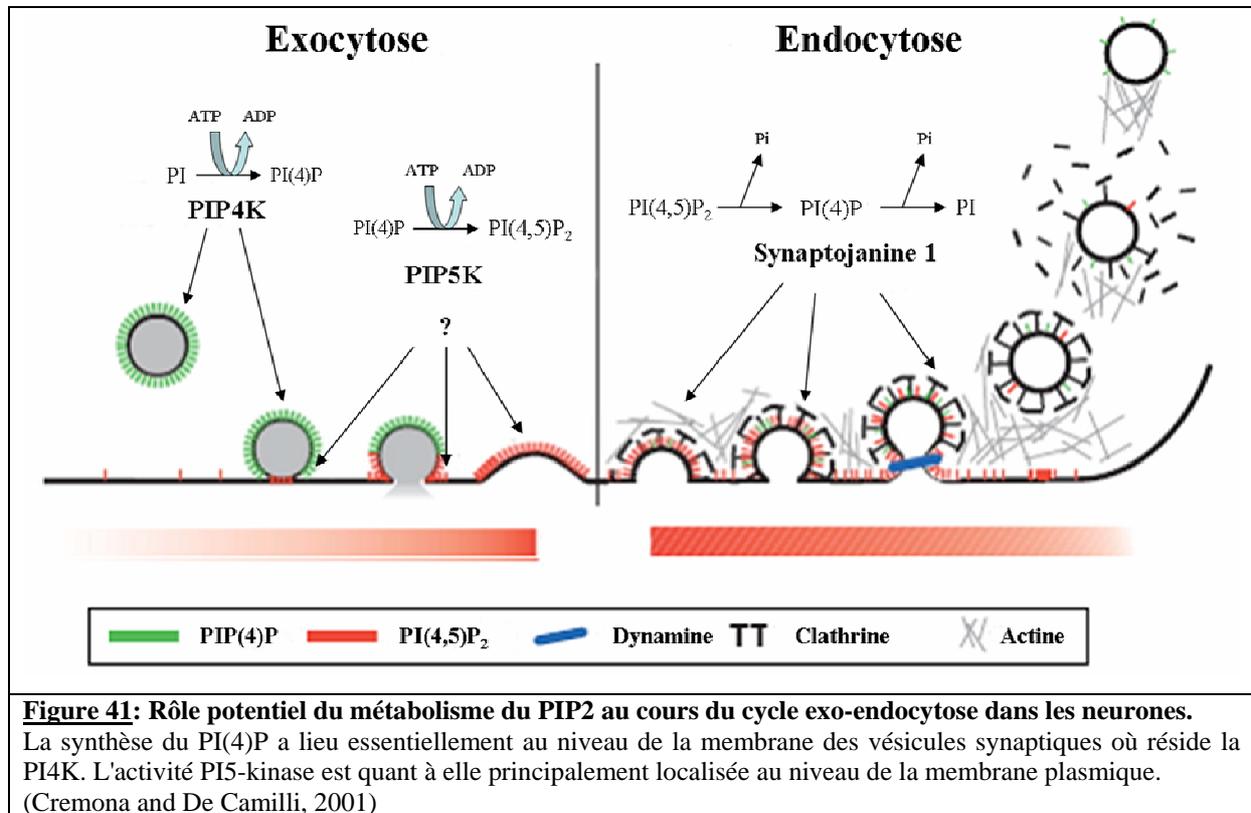


Il est évidemment tentant de mettre ce type d'approche au service de la neurosécrétion. Par le biais de cette technique, l'architecture du cytosquelette d'actine pourrait être comparée dans les cellules chromaffines au repos et stimulées. La géométrie des filaments ainsi que la distribution des granules de sécrétion au sein du réseau d'actine et au niveau des sites d'exocytose pourraient également apporter de précieuses informations. Ainsi, l'étude des changements dynamiques du cytosquelette d'actine au cours de la sécrétion par tomographie électronique permettrait sans doute de mettre en évidence un type d'organisation de l'actine spécifiquement requis pour l'exocytose et/ou l'endocytose. Il restera ensuite à prouver que ces structures spécifiques des sites d'exocytose sont bien induites par la cascade moléculaire stimulée par Cdc42.

II.6 Régulation de la dynamique de l'actine par les lipides : une collaboration étroite avec le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

L'implication des lipides a toujours été reconnue comme importante dans les évènements de trafic membranaire, mais à l'heure actuelle ils ne sont plus considérés d'un point de vue simplement structural. En effet, on leur attribue une fonction cruciale dans la régulation de certaines étapes du trafic membranaire. Le cholestérol, par exemple, présente la particularité de s'associer à d'autres lipides comme les sphingolipides et de former des micro-domaines dans la membrane plasmique (Maekawa *et al.*, 2003). Ces micro-domaines peuvent séquestrer des protéines spécifiques et en exclure d'autres, permettant ainsi de constituer des plates-formes fonctionnelles pour une voie moléculaire précise (Simons and Toomre, 2000). La déplétion en cholestérol dans divers types cellulaires a pour effet d'inhiber l'exocytose (Lafont *et al.*, 1999; Chamberlain *et al.*, 2001; Waseem *et al.*, 2006). En accord avec ces données, les travaux de S. Chasserot-Golaz dans notre laboratoire montrent la formation de radiaux lipidiques au niveau des sites d'exocytose dans les cellules chromaffines (Chasserot-Golaz *et al.*, 2005). Un autre lipide important est l'acide phosphatidique (PA), qui présente des propriétés fusio-géniques. Synthétisé *via* plusieurs voies, son insertion dans les membranes peut provoquer des changements locaux de courbure (Summers *et al.*, 1996). Son implication au cours de l'exocytose a été suggérée au laboratoire par Nicolas Vitale (Vitale *et al.*, 2001), en précisant que le PA concerné au cours de ce processus est celui produit par la phospholipase D (PLD). Toutefois, ce lipide possède d'autres caractéristiques, comme celles de recruter des protéines cytosoliques ou de stimuler des activités enzymatiques, faisant de lui un élément clé des fonctions cellulaires. Enfin, le dernier lipide dont je voudrais parler et sur lequel je voudrais m'étendre ici est le phosphatidylinositol (4-5)-bisphosphate (PIP2). Inséré dans la couche interne de la membrane plasmique, il peut interagir avec un grand nombre de protéines, ce qui lui permet de contrôler les évènements à l'interface cytosol-membrane. Il peut se lier à de nombreuses protéines et réguler leur activité, gérer les interactions entre la membrane plasmique et le cytosquelette d'actine ou encore jouer un rôle dans les cascades de transduction des signaux extracellulaires (Di Paolo and De Camilli, 2006). Le rôle du PIP2 dans les processus d'exo-endocytose nous intéresse particulièrement, et ce pour deux raisons: il est capable de réguler la dynamique du cytosquelette d'actine à différents niveaux (Yin and Janmey, 2003) et sa synthèse peut être régulée par les GTPases de la famille Rho via les phosphoinositides kinases (PIK).

La synthèse de PIP₂ est fonction des processus cellulaires, et de façon intéressante la production de ce phosphoinositide au cours de l'exo-endocytose semble être cyclique (figure 41).



La synthèse du PIP₂ est sous le contrôle de deux enzymes, la phosphatidylinositol-4 kinase (PI4K) et la phosphatidylinositol-5 kinase (PI5K). Un des aspects intéressants de la synthèse du PIP₂ est qu'elle peut être contrôlée par les GTPases de la famille Rho. En effet, Tolia et collaborateurs ont montré que Rac stimule la synthèse du PIP₂ en activant la PI(4)P 5-kinase (Tolia *et al.*, 2000). De plus, des travaux plus récents ont mis en évidence une activation de cette kinase par RhoA, Rac1 et Cdc42 (Weernink *et al.*, 2004). Dans notre laboratoire, Gasman et collaborateurs ont montré en 1998 que RhoA stimule l'activité de la PI4K dans les cellules chromaffines (Gasman *et al.*, 1998).

La PI4K étant une protéine intégrante de la membrane des granules/vésicules dans les cellules neuroendocrines et les neurones, il est tentant d'imaginer une synthèse de PIP₂ spécifiquement au niveau de ces organelles. En utilisant une sonde PH-GFP, le groupe de Holz démontra en 2000 que le PIP₂ réside majoritairement à la membrane plasmique dans les cellules chromaffines (Holz *et al.*, 2000) et non pas sur les granules. Par la suite, l'importance du PIP₂ a été largement démontrée dans les processus d'exocytose. En effet, l'inactivation génique par knock-out ou ARN interférence de la PI5K bloque drastiquement la sécrétion

dans les cellules neuroendocrines (Waselle *et al.*, 2005) et les neurones (Di Paolo *et al.*, 2004) en empêchant la production de PIP2. La combinaison des techniques d'ampérométrie, de mesure de capacitance et de microscopie électronique a permis ensuite de montrer que l'absence de PIP2 diminue la taille de la population granulaire rapidement libérable (RRP) (Gong *et al.*, 2005; Milosevic *et al.*, 2005). De plus, une étude réalisée sur les PC12 montre la formation de micro-domaines à PIP2 au cours de l'exocytose (Aoyagi *et al.*, 2005). De façon intéressante, ces auteurs démontrent également que les micro-domaines de PIP2 sont enrichis en syntaxine et constituent les sites d'arrimages des granules de sécrétion.

L'ensemble de ces données démontre que de toute évidence, le PIP2 a un rôle clé au cours de l'exocytose dans les cellules neuroendocrines mais la question est de savoir de quelle façon il intervient. Dans le contexte de mon travail, le PIP2 a retenu mon attention dans la mesure où il est connu pour moduler la dynamique du cytosquelette d'actine et ce de différentes manières. Par exemple, le PIP2 inhibe l'activité des protéines de fragmentation comme la gelsoline, la cofiline ou encore la scindérine (Takenawa and Miki, 2001; Yin and Janmey, 2003). Un élément intéressant est que ces protéines, notamment la scindérine et la gelsoline, sont connues pour participer à la déstructuration de la barrière d'actine lors de la stimulation de l'exocytose (Bader *et al.*, 1986; Vitale *et al.*, 1991; Miyamoto *et al.*, 1993). Suite à leurs travaux sur le couple RhoA/PI4K en 1998, Gasman et collaborateurs proposaient une hypothèse selon laquelle le PIP2 pourrait participer au maintien de la barrière d'actine en inhibant ces protéines de fragmentation (Gasman *et al.*, 1998). Les résultats décrits précédemment montrent que la synthèse du PIP2 a préférentiellement lieu au niveau des sites d'exocytose. Or, à cette étape du processus (post-arrimage), le réseau d'actine est déjà déstructuré. Un rôle du PIP2 dans le maintien de la barrière apparaît donc moins évident. En revanche, étant donné que nous avons démontré qu'une polymérisation *de novo* d'actine au cours des étapes tardives de l'exocytose est importante, il est tentant d'imaginer que le PIP2 inhibe l'activité de la scindérine et des autres protéines de fragmentation de l'actine à ce moment et qu'il puisse ainsi maintenir l'intégrité des filaments importants pour la fin de l'exocytose.

Une autre hypothèse intéressante serait une action du PIP2 sur l'activité de N-WASP. Il a été démontré *in vitro* que le PIP2 peut se lier à N-WASP *via* son domaine basique, qu'il est indispensable à son activation (Higgs and Pollard, 2000) et qu'il peut agir en synergie avec Cdc42 pour stimuler son activité de polymérisation de l'actine (Rohatgi *et al.*, 2000). L'augmentation de PIP2 au cours de l'exocytose pourrait donc très bien entretenir l'activité de N-WASP indispensable à la synthèse d'actine.

Comme indiqué précédemment, le PIP2 est retrouvé au niveau de la membrane plasmique, ce qui permet le recrutement membranaire des protéines avec lesquelles il interagit. Cette interaction peut se faire par l'intermédiaire de plusieurs types de domaines, comme par exemple les domaines C2 ou PH. Il est intéressant de noter que l'intersectine possède de tels domaines. Dans notre étude sur l'intersectine, nous avons pu observer que les domaines DH-PH et DH-PH-C2 surexprimés dans les cellules PC12 sont localisés en périphérie cellulaire, tandis que le domaine DH seul reste principalement soluble (publication 2). Ces données laissent à penser que le domaine PH est déterminant dans l'adressage de l'intersectine à la membrane plasmique et donc suggèrent une possible intervention du PIP2 dans cette fonction (voir discussion publication 2). D'un autre côté, les travaux de Snyder et collaborateurs montrent que l'affinité du domaine PH de certaines protéines Dbl, dont l'intersectine, est trop faible pour assurer à lui seul l'adressage à la membrane plasmique (Snyder *et al.*, 2001). Cependant, une étude récente menée par le même groupe démontre que d'une part, la dimérisation du tandem DH/PH augmente considérablement l'affinité pour le PIP2 et que d'autre part, l'interaction PH/PIP2 s'avère indispensable à l'activité d'échange (Baumeister *et al.*, 2006). Bien que nous n'ayons pas étudié la possibilité d'une oligomérisation de l'intersectine, il est fort possible, au vu de ces données, que la formation de PIP2 au niveau des sites d'exocytose permette la localisation de l'intersectine et facilite son rôle d'activateur sur Cdc42.

J'ai volontairement choisi de traiter le rôle potentiel du PIP2 en rapport avec les protéines (Cdc42, N-WASP, intersectine) et les mécanismes (exocytose, dynamique de l'actine) que j'ai étudiés pendant mon doctorat. Cependant, il faut garder en mémoire que la régulation par le PIP2 est complexe car il contrôle l'activité d'autres protéines de l'exocytose (PLD, synaptotagmine, rabphilin, CAPS,...) et de l'endocytose (dynamine, protéines adaptatrices, epsine...), faisant de lui un co-facteur important pour chacun de ces processus mais aussi potentiellement un facteur de couplage de ces deux phénomènes. Il semblerait donc qu'il soit plus un élément de modulation des intervenants qu'un acteur en solo.

III. Régulation des GTPases

III.1. Quel lien entre la régulation et la spécificité d'action des GTPases?

Au sein d'une cellule, les mêmes GTPases Rho peuvent être impliquées dans plusieurs fonctions. Par exemple, Cdc42 est impliquée dans des rôles aussi divers que la croissance neuritique, l'exocytose, le contrôle du cycle cellulaire ou encore l'établissement de la polarité. Ce même type d'implications multiples est également observé pour Rho et Rac (Jaffe and Hall, 2005). La question est de savoir de quelle façon la cellule va corrélérer l'activation d'une GTPase avec une fonction donnée. Les expériences de précipitation de Cdc42-GTP (pull-down) que nous avons effectuées sur des cellules PC12 ont montré que seulement 4% de la totalité de Cdc42 est activée lors de l'exocytose (publication 1). Même si cette proportion est probablement sous-estimée du fait de la technique utilisée, cela suggère un contrôle étroit de la machinerie d'activation de Cdc42. Ainsi, seule la fraction de Cdc42 dédiée à l'exocytose va être sollicitée. Une hypothèse intéressante est qu'une telle régulation soit conférée par les facteurs d'échange. En effet, comparés aux GAP ou aux GDI, les facteurs d'échange sont très nombreux pour un même type de GTPase et pourraient très bien leur attribuer une spécificité d'action. Si tel est le cas, de quelle façon cela peut-il se passer?

Il est reconnu que la localisation et/ou le recrutement d'une protéine au niveau d'un site peut lui attribuer une spécificité d'action. La localisation et le recrutement font partie des modes de régulation des GEF, et on peut donc penser qu'il y a une corrélation entre la régulation du facteur d'échange et la spécificité qu'il peut attribuer à sa GTPase. Dans ce contexte, la modulation de l'activité d'un GEF peut passer par trois mécanismes principaux: i) séquestration dans un compartiment particulier et recrutement suite à un stimulus, ii) intégration et stabilisation au sein d'un complexe protéique, et iii) contrôle de l'activité par l'intermédiaire de boucles de régulation qui peuvent parfois faire intervenir l'effecteur de la GTPase à activer (Rossman *et al.*, 2005). J'aimerais ici brièvement illustrer chacun de ces cas et essayer d'imaginer si tel ou tel mode de régulation pourrait s'appliquer à l'intersectine dans le contexte de l'exocytose.

Dans la levure, les travaux de Shimada ont montré que Cdc24, le facteur d'échange de Cdc42, doit passer du noyau au cytoplasme lors de la polarisation des cellules (Shimada *et al.*, 2000). Il est séquestré dans le noyau par un facteur nucléaire, Far1, qui est détruit lorsque les récepteurs aux phéromones sont activés. Cdc24 passe alors dans le cytoplasme et va se positionner à proximité des récepteurs dans le but de permettre une polymérisation d'actine polarisée et par cette voie de contrôler la polarisation cellulaire dans un contexte particulier.

Ce mode d'action a été retrouvé chez les mammifères avec Net1, un facteur d'échange de la famille Dbl spécifique de RhoA, qui présente la particularité d'être séquestré dans le noyau. Il n'a pas été étudié dans un contexte de sécrétion, mais dans les fibroblastes, sa translocation coïncide avec une augmentation de l'activité de RhoA se traduisant par la formation de fibres de stress (Schmidt and Hall, 2002b). L'utilisation de divers types de mutants de Net1 a permis aux auteurs de préciser que le domaine PH est important pour la translocation, ce qui ajoute une fonction supplémentaire à sa capacité de liaison aux membranes potentiellement due au PIP2. De la même façon, Rac1 possède un facteur d'échange Tiam1 qui est recruté du cytoplasme vers la membrane plasmique grâce à son domaine PH et qui peut induire la formation de replis membranaires *via* l'activation de Rac1 (Michiels *et al.*, 1997). Ces données suggèrent donc un mécanisme répandu de spécialisation de la GTPase induit par la localisation d'un facteur d'échange. Dans notre cas, la spécificité d'action de Cdc42 sur l'exocytose pourrait très bien être conférée par la localisation de l'intersectine 1-L au niveau des sites d'exocytose. Cette localisation préférentielle pourrait avoir lieu *via* le PIP2 (voir chapitre II-6).

Un autre mode de régulation des facteurs d'échange est l'intégration et la stabilisation du GEF au sein d'un complexe protéique. L'éphexine, facteur d'échange pouvant agir sur RhoA, Rac1 et Cdc42, présente la particularité d'interagir avec des récepteurs à tyrosine kinase EphA4. Du fait de l'intégration de l'éphexine au sein de ce complexe protéique, le changement de conformation induit par l'agrégation de ces récepteurs a pour effet d'augmenter son activité d'échange sur RhoA et diminuer celle concernant Rac et Cdc42 (Shamah *et al.*, 2001), constituant ainsi un moyen de contrôler à la fois l'activité du facteur d'échange mais aussi la spécificité de la GTPase sollicitée par un signal particulier. Quel type d'interaction protéique pourrait permettre de maintenir l'intersectine 1-L au niveau des sites d'exocytose? L'hypothèse la plus intéressante que l'on puisse faire ici est basée sur l'interaction de l'intersectine avec SNAP25. En effet, cette démonstration a été décrite en 1999 (Okamoto *et al.*, 1999), mais aucune explication fonctionnelle n'a été proposée. Ainsi, en coopération avec le PIP2, SNAP25 pourrait permettre de maintenir l'intersectine au niveau des sites d'exocytose.

Enfin, le cas de la régulation par l'intermédiaire de boucles de régulation pouvant passer par l'effecteur de la GTPase à activer est particulièrement intéressant. Il a déjà été décrit en 2001 pour la GTPase Rab5, dont l'effecteur la rabaptine doit interagir avec son GEF rabex pour l'activer (Lippe *et al.*, 2001). Cet exemple est aussi parfaitement illustré par l'intersectine, qui est régulée par N-WASP, l'effecteur de la GTPase qu'elle active (Hussain *et*

al., 2001; Irie and Yamaguchi, 2002), mais les mécanismes exacts de cette régulation sont encore inconnus.

III.2. Quelle GAP pour Cdc42 au cours de l'exocytose?

Ayant étudié l'activation de Cdc42 au cours de l'exocytose, il semblait intéressant de se pencher sur la molécule responsable de son inactivation. Dans les cellules neuroendocrines, l'implication de Cdc42 dans les rouages de l'exocytose laisse à penser que la libération hormonale est un mécanisme qui pourrait être totalement asservi à la cinétique d'activation/inactivation de cette GTPase. En effet, les cellules ne retournent à l'état de repos et la sécrétion des hormones n'est interrompue que lorsque Cdc42 est inactivée (publication 1). On conçoit dès lors aisément l'importance fonctionnelle de la protéine GAP qui assure cette inactivation et qui pour l'heure est totalement inconnue.

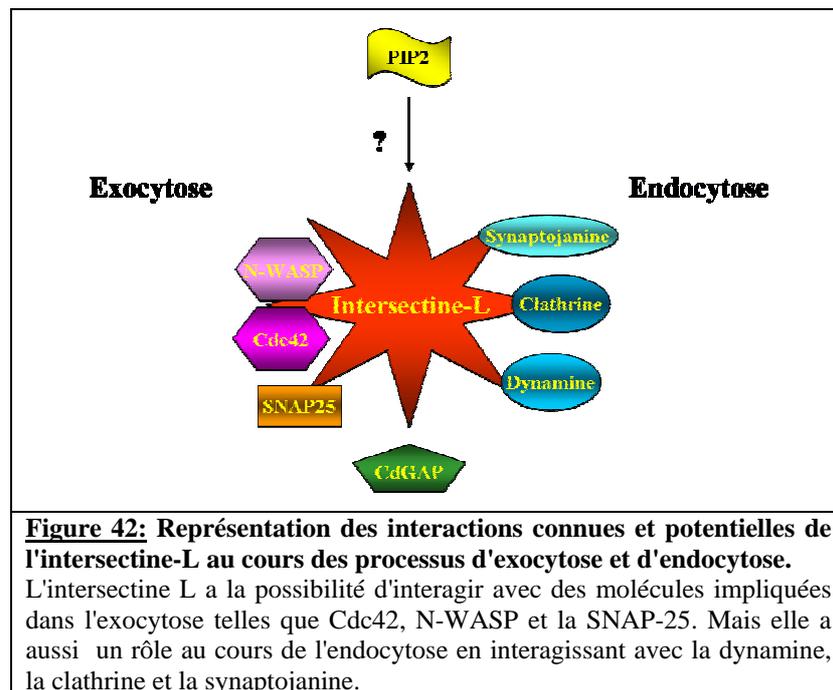
Le groupe de N. Lamarche-Vane a montré que l'activité de CdGAP, une GAP pour Rac1 et Cdc42, est étroitement régulée par l'intersectine (Jenna *et al.*, 2002). CdGAP est une protéine de 89 kDa qui est exprimée ubiquitairement. Elle possède le domaine GAP commun à toutes les protéines de cette famille ainsi que des domaines riches en proline. L'interaction de l'intersectine avec CdGAP présente la particularité d'inhiber l'activité GAP de CdGAP. Dans le cadre de notre étude, cela permettrait d'imaginer qu'une fois Cdc42 activée par l'intersectine, il y ait perte de la liaison entre CdGAP et l'intersectine, levant l'inhibition de CdGAP qui pourrait inactiver ainsi Cdc42. Dans ce contexte, CdGAP représente un candidat de choix pour le rôle d'inactivateur de Cdc42 au cours de l'exocytose. Il serait intéressant d'invalider la fonction de CdGAP avec un ARN interférence afin de voir si cela modifie l'état d'activation de Cdc42 au cours de la sécrétion et l'activité sécrétrice *per se*.

L'action de la GAP de Cdc42 dans le cadre de l'exocytose pourrait être déclenchée par un signal comme la variation de la courbure membranaire consécutive à la formation des vésicules d'endocytose. En effet, certains domaines ont des propriétés de senseurs de courbure et sont capables de réguler l'activité de la protéine qui les contient. Les domaines BAR (Bin, Amphiphysin, Rvs) en font partie et sont retrouvés dans certaines GAP des Rho comme l'oligophréne ou la nadrine (Itoh and De Camilli, 2006). Dans les neurones, le domaine BAR peut moduler négativement l'activité GAP de l'oligophréne (Fauchereau *et al.*, 2003), suggérant une coordination entre l'état de courbure des membranes et le déclenchement de l'activité de la protéine. On pourrait imaginer un mécanisme similaire pour le déclenchement de l'activité de la GAP de Cdc42, qui inhiberait l'activité de la protéine à partir d'un certain stade de déformation de la membrane, témoin d'un processus d'exocytose avancée ou de la

mise en place de l'endocytose. Il semblerait toutefois qu'à l'heure actuelle, il n'existe pas de GAP pour Cdc42 possédant un tel domaine.

III.3. Un rôle multiple pour l'intersectine

L'intersectine est une protéine dont la fonction a été décrite principalement au cours de l'endocytose dépendante de la clathrine (Hussain *et al.*, 1999), mais elle interagit aussi avec d'autres molécules, dont la SNAP25 qui est une molécule impliquée au cours de l'exocytose (Okamoto *et al.*, 1999) (figure 42).



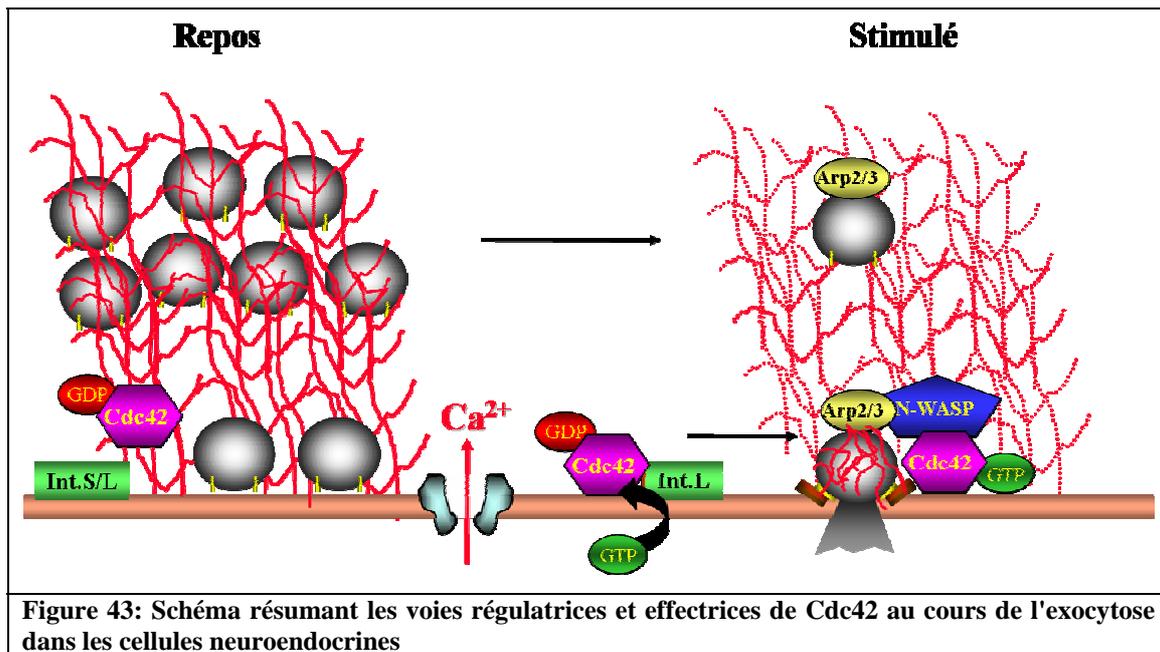
Lors de mon doctorat, nous avons mis en évidence pour la première fois son rôle au cours de l'exocytose en tant que facteur d'échange de Cdc42 (publication 2). Il serait alors tentant d'imaginer que la SNAP25 permette le recrutement de l'intersectine au niveau des sites d'exocytose. Elle pourrait mettre en place la machinerie moléculaire nécessaire à ce processus, "balisant" en quelque sorte les sites d'exocytose. En intervenant à la fois dans l'exo- et l'endocytose, l'intersectine devient un candidat idéal pour jouer un rôle dans le couplage entre ces deux fonctions, sachant que tant au niveau spatial que temporel l'exocytose et l'endocytose sont deux phénomènes étroitement liés.

Dans l'ensemble, nos données concernant l'intersectine1-L montrent qu'elle est localisée au niveau la membrane plasmique à la fois dans les cellules au repos et les cellules stimulées. De par sa double fonctionnalité, elle pourrait donc y réguler l'exocytose et

potentiellement l'endocytose. Si l'on s'accorde sur le fait que ces deux phénomènes peuvent avoir lieu au même endroit, cette hypothèse peut paraître plausible voire très séduisante. Mais une même molécule d'intersectine est-elle capable de gérer les deux processus? En effet, la liaison de l'intersectine avec les molécules de l'endocytose telles que la clathrine, la synaptojanine et la dynamine a été démontrée *in vitro* (Hussain *et al.*, 1999), et il serait intéressant d'étudier ces interactions multiples *in vivo*. Enfin, avant de proposer un rôle de l'intersectine dans l'endocytose faisant suite à la sécrétion dans les cellules neuroendocrines, il faudrait démontrer en premier lieu que le granule ayant libéré son contenu est bien recapturé par un processus dépendant de la clathrine. Il serait intéressant d'étudier par immunoprécipitation les interactions ayant lieu à l'état de repos et à l'état stimulé, afin de mettre en évidence le déroulement séquentiel des liaisons avec les différents acteurs impliqués dans l'exocytose et l'endocytose. Des expériences de co-marquages en microscopie électronique pourraient aussi donner une idée des associations moléculaires de l'intersectine durant les étapes des processus d'exo- et d'endocytose.

IV. Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse a permis d'éclaircir certains aspects de la régulation et du rôle de la dynamique de l'actine au cours de l'exocytose. En démontrant que Cdc42 contrôle la synthèse *de novo* d'actine au cours des étapes tardives de l'exocytose, nous avons montré que le réseau d'actine ne se cantonne plus à une simple barrière physique mais joue un rôle positif. L'un des points forts de cette étude est que nous avons pu mettre en évidence pour la première fois une cascade moléculaire dédiée à la mise en place de structures d'actine indispensables à l'exocytose (figure 43).



Par la suite, nous avons été capables de proposer une voie régulatrice de Cdc42 en démontrant son activation par l'intersectine 1-L au niveau des sites d'exocytose lors de la sécrétion. Cet aspect de nos travaux est assez novateur car il constitue la première démonstration d'un rôle de l'intersectine dans les phénomènes d'exocytose.

L'ensemble de mes travaux soulève de nouvelles questions et amène ainsi de nouvelles perspectives de travail. Les points qu'il sera important d'aborder dans le futur concernent notamment la nature et le rôle des filaments d'actine néo-synthétisés, la fonction de Rac dans l'exocytose, le couplage exo-endocytose ou encore la mise en évidence de la GAP inactivant Cdc42.

Enfin, j'aimerais terminer ici en discutant très succinctement l'importance de nos travaux dans un contexte physio-pathologique. En effet, de nombreuses pathologies sont associées à un défaut de sécrétion par exocytose. Toute anomalie de sécrétion de l'insuline par les cellules du pancréas peut aboutir au diabète. La dégranulation massive des mastocytes est à l'origine d'allergies et peut entraîner des chocs anaphylactiques fatals. La sécrétion par les adipocytes de peptides régulateurs comme la leptine ou le TNF-alpha peut favoriser l'obésité, le développement de l'insulinorésistance (diabète de type 2) ainsi que certaines maladies cardiovasculaires. Un excès de sécrétion de cortisol provoque un syndrome de Cushing et la plupart des cancers de type endocrine sont associés à un dysfonctionnement de la sécrétion hormonale. De plus, il est clairement établi à ce jour que les GTPases de la famille Rho ainsi

que leur(s) facteur(s) d'échange jouent un rôle primordial dans les phénomènes de cancérogenèse.

L'ensemble de ces données physio-pathologiques place l'étude des mécanismes d'exocytose et de la signalisation des GTPases Rho au cœur des préoccupations de luttres biomédicales. Ainsi, la connaissance des étapes moléculaires de la sécrétion impliquant les protéines Rho représente un enjeu biologique, pharmacologique et thérapeutique visant à lutter contre les situations pathologiques induites par les modifications de l'activité sécrétrice.

Références bibliographiques

A

Adamo, J.E., Moskow, J.J., Gladfelter, A.S., Viterbo, D., Lew, D.J., and Brennwald, P.J. (2001). Yeast Cdc42 functions at a late step in exocytosis, specifically during polarized growth of the emerging bud. *J Cell Biol* 155, 581-592.

Ahras, M., Otto, G.P., and Tooze, S.A. (2006). Synaptotagmin IV is necessary for the maturation of secretory granules in PC12 cells. *J Cell Biol* 173, 241-251.

Allersma, M.W., Bittner, M.A., Axelrod, D., and Holz, R.W. (2006). Motion matters: secretory granule motion adjacent to the plasma membrane and exocytosis. *Mol Biol Cell* 17, 2424-2438.

Amann, K.J., and Pollard, T.D. (2001). The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments. *Nat Cell Biol* 3, 306-310.

Anton, I.M., and Jones, G.E. (2006). WIP: a multifunctional protein involved in actin cytoskeleton regulation. *Eur J Cell Biol* 85, 295-304.

Aoyagi, K., Sugaya, T., Umeda, M., Yamamoto, S., Terakawa, S., and Takahashi, M. (2005). The activation of exocytotic sites by the formation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate microdomains at syntaxin clusters. *J Biol Chem* 280, 17346-17352.

Apodaca, G. (2001). Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic* 2, 149-159.

Artalejo, C.R., Elhamdani, A., and Palfrey, H.C. (2002). Sustained stimulation shifts the mechanism of endocytosis from dynamin-1-dependent rapid endocytosis to clathrin- and dynamin-2-mediated slow endocytosis in chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6358-6363.

Artalejo, C.R., Henley, J.R., McNiven, M.A., and Palfrey, H.C. (1995). Rapid endocytosis coupled to exocytosis in adrenal chromaffin cells involves Ca²⁺, GTP, and dynamin but not clathrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8328-8332.

Ashton, A.C., and Ushkaryov, Y.A. (2005). Properties of synaptic vesicle pools in mature central nerve terminals. *J Biol Chem* 280, 37278-37288.

Aspenstrom, P., Fransson, A., and Saras, J. (2004). Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J* 377, 327-337.

Augustine, G.J., and Neher, E. (1992). Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 450, 247-271.

Aunis, D., and Bader, M.F. (1988). The cytoskeleton as a barrier to exocytosis in secretory cells. *J Exp Biol* 139, 253-266.

Aunis, D., and Perrin, D. (1984). Chromaffin granule membrane-F-actin interactions and spectrin-like protein of subcellular organelles: a possible relationship. *J Neurochem* 42, 1558-1569.

B

Bader, M.F., and Aunis, D. (1983). The 97-kD alpha-actinin-like protein in chromaffin granule membranes from adrenal medulla: evidence for localization on the cytoplasmic surface and for binding to actin filaments. *Neuroscience* 8, 165-181.

Bader, M.F., Garcia, A.G., Ciesielski-Treska, J., Thierse, D., and Aunis, D. (1983). Contractile proteins in chromaffin cells. *Prog Brain Res* 58, 21-29.

- Bader, M.F., Trifaro, J.M., Langley, O.K., Thierse, D., and Aunis, D. (1986). Secretory cell actin-binding proteins: identification of a gelsolin-like protein in chromaffin cells. *J Cell Biol* *102*, 636-646.
- Balasubramanian, M.K., Feoktistova, A., McCollum, D., and Gould, K.L. (1996). Fission yeast Sop2p: a novel and evolutionarily conserved protein that interacts with Arp3p and modulates profilin function. *Embo J* *15*, 6426-6437.
- Barral, D.C., and Seabra, M.C. (2004). The melanosome as a model to study organelle motility in mammals. *Pigment Cell Res* *17*, 111-118.
- Baumeister, M.A., Rossman, K.L., Sondek, J., and Lemmon, M.A. (2006). The Dbs PH domain contributes independently to membrane targeting and regulation of guanine nucleotide exchange activity. *Biochem J*.
- Bayer, M.J., Reese, C., Buhler, S., Peters, C., and Mayer, A. (2003). Vacuole membrane fusion: V0 functions after trans-SNARE pairing and is coupled to the Ca²⁺-releasing channel. *J Cell Biol* *162*, 211-222.
- Bear, J.E., Rawls, J.F., and Saxe, C.L., 3rd. (1998). SCAR, a WASP-related protein, isolated as a suppressor of receptor defects in late Dictyostelium development. *J Cell Biol* *142*, 1325-1335.
- Becherer, U., and Rettig, J. (2006). Vesicle pools, docking, priming, and release. *Cell Tissue Res*.
- Bernards, A. (2003). GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and Drosophila. *Biochim Biophys Acta* *1603*, 47-82.
- Bernards, A., and Settleman, J. (2005). GAPs in growth factor signalling. *Growth Factors* *23*, 143-149.
- Bloom, O., Evergren, E., Tomilin, N., Kjaerulff, O., Low, P., Brodin, L., Pieribone, V.A., Greengard, P., and Shupliakov, O. (2003). Colocalization of synapsin and actin during synaptic vesicle recycling. *J Cell Biol* *161*, 737-747.
- Bourne, J., Morgan, J.R., and Pieribone, V.A. (2006). Actin polymerization regulates clathrin coat maturation during early stages of synaptic vesicle recycling at lamprey synapses. *J Comp Neurol* *497*, 600-609.
- Brill, S., Li, S., Lyman, C.W., Church, D.M., Wasmuth, J.J., Weissbach, L., Bernards, A., and Snijders, A.J. (1996). The Ras GTPase-activating-protein-related human protein IQGAP2 harbors a potential actin binding domain and interacts with calmodulin and Rho family GTPases. *Mol Cell Biol* *16*, 4869-4878.
- Broadie, K., Prokop, A., Bellen, H.J., O'Kane, C.J., Schulze, K.L., and Sweeney, S.T. (1995). Syntaxin and synaptobrevin function downstream of vesicle docking in Drosophila. *Neuron* *15*, 663-673.
- Brown, A.M., O'Sullivan, A.J., and Gomperts, B.D. (1998). Induction of exocytosis from permeabilized mast cells by the guanosine triphosphatases Rac and Cdc42. *Mol Biol Cell* *9*, 1053-1063.
- Brunet, N., Morin, A., and Olofsson, B. (2002). RhoGDI-3 regulates RhoG and targets this protein to the Golgi complex through its unique N-terminal domain. *Traffic* *3*, 342-357.

C

- Camonis, J.H., and White, M.A. (2005). Ral GTPases: corrupting the exocyst in cancer cells. *Trends Cell Biol* *15*, 327-332.
- Carrier, M.F. (1991). Actin: protein structure and filament dynamics. *J Biol Chem* *266*, 1-4.
- Carrier, M.F., Nioche, P., Broutin-L'Hermite, I., Boujemaa, R., Le Clainche, C., Egile, C., Garbay, C., Ducruix, A., Sansonetti, P., and Pantaloni, D. (2000). GRB2 links signaling to actin assembly by enhancing interaction of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASp) with actin-related protein (ARP2/3) complex. *J Biol Chem* *275*, 21946-21952.

Carrier, M.F., Pantaloni, D., and Korn, E.D. (1987). The mechanisms of ATP hydrolysis accompanying the polymerization of Mg-actin and Ca-actin. *J Biol Chem* 262, 3052-3059.

Caron, E. (2002). Regulation of Wiskott-Aldrich syndrome protein and related molecules. *Curr Opin Cell Biol* 14, 82-87.

Ceccarelli, B., Hurlbut, W.P., and Mauro, A. (1973). Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* 57, 499-524.

Chamberlain, L.H., Burgoyne, R.D., and Gould, G.W. (2001). SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5619-5624.

Chasserot-Golaz, S., Vitale, N., Sagot, I., Delouche, B., Dirrig, S., Pradel, L.A., Henry, J.P., Aunis, D., and Bader, M.F. (1996). Annexin II in exocytosis: catecholamine secretion requires the translocation of p36 to the subplasmalemmal region in chromaffin cells. *J Cell Biol* 133, 1217-1236.

Chasserot-Golaz, S., Vitale, N., Umbrecht-Jenck, E., Knight, D., Gerke, V., and Bader, M.F. (2005). Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Mol Biol Cell* 16, 1108-1119.

Chen, J.L., Fucini, R.V., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Stamnes, M. (2005). Coatomer-bound Cdc42 regulates dynein recruitment to COPI vesicles. *J Cell Biol* 169, 383-389.

Chenevert, J., Corrado, K., Bender, A., Pringle, J., and Herskowitz, I. (1992). A yeast gene (BEM1) necessary for cell polarization whose product contains two SH3 domains. *Nature* 356, 77-79.

Cherfils, J., and Chardin, P. (1999). GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 24, 306-311.

Chowdhury, H.H., Kreft, M., and Zorec, R. (2002). Distinct effect of actin cytoskeleton disassembly on exo- and endocytic events in a membrane patch of rat melanotrophs. *J Physiol* 545, 879-886.

Chowdhury, H.H., Popoff, M.R., and Zorec, R. (1999). Actin cytoskeleton depolymerization with clostridium spiroforme toxin enhances the secretory activity of rat melanotrophs. *J Physiol* 521 Pt 2, 389-395.

Cory, G.O., Cramer, R., Blanchoin, L., and Ridley, A.J. (2003). Phosphorylation of the WASP-VCA domain increases its affinity for the Arp2/3 complex and enhances actin polymerization by WASP. *Mol Cell* 11, 1229-1239.

Cremona, O., and De Camilli, P. (2001). Phosphoinositides in membrane traffic at the synapse. *J Cell Sci* 114, 1041-1052.

D

Da Costa, S.R., Sou, E., Xie, J., Yarber, F.A., Okamoto, C.T., Pidgeon, M., Kessels, M.M., Mircheff, A.K., Schechter, J.E., Qualmann, B., and Hamm-Alvarez, S.F. (2003). Impairing actin filament or syndapin functions promotes accumulation of clathrin-coated vesicles at the apical plasma membrane of acinar epithelial cells. *Mol Biol Cell* 14, 4397-4413.

Dayel, M.J., Holleran, E.A., and Mullins, R.D. (2001). Arp2/3 complex requires hydrolyzable ATP for nucleation of new actin filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14871-14876.

de Toledo, M., Senic-Matuglia, F., Salamero, J., Uze, G., Comunale, F., Fort, P., and Blangy, A. (2003). The GTP/GDP cycling of rho GTPase TCL is an essential regulator of the early endocytic pathway. *Mol Biol Cell* 14, 4846-4856.

Defacque, H., Bos, E., Garvalov, B., Barret, C., Roy, C., Mangeat, P., Shin, H.W., Rybin, V., and Griffiths, G. (2002). Phosphoinositides regulate membrane-dependent actin assembly by latex bead phagosomes. *Mol Biol Cell* 13, 1190-1202.

Defacque, H., Egeberg, M., Habermann, A., Diakonova, M., Roy, C., Mangeat, P., Voelter, W., Marriott, G., Pfannstiel, J., Faulstich, H., and Griffiths, G. (2000). Involvement of ezrin/moesin in de novo actin assembly on phagosomal membranes. *Embo J* 19, 199-212.

Del Pozo, M.A., Kiosses, W.B., Alderson, N.B., Meller, N., Hahn, K.M., and Schwartz, M.A. (2002). Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. *Nat Cell Biol* 4, 232-239.

DeMali, K.A., Barlow, C.A., and Burridge, K. (2002). Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *J Cell Biol* 159, 881-891.

Desnos, C., Schonn, J.S., Huet, S., Tran, V.S., El-Amraoui, A., Raposo, G., Fanget, I., Chapuis, C., Menasche, G., de Saint Basile, G., Petit, C., Cribier, S., Henry, J.P., and Darchen, F. (2003). Rab27A and its effector MyRIP link secretory granules to F-actin and control their motion towards release sites. *J Cell Biol* 163, 559-570.

Di Paolo, G., and De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443, 651-657.

Di Paolo, G., Moskowitz, H.S., Gipson, K., Wenk, M.R., Voronov, S., Obayashi, M., Flavell, R., Fitzsimonds, R.M., Ryan, T.A., and De Camilli, P. (2004). Impaired PtdIns(4,5)P₂ synthesis in nerve terminals produces defects in synaptic vesicle trafficking. *Nature* 431, 415-422.

Dillon, C., and Goda, Y. (2005). The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. *Annu Rev Neurosci* 28, 25-55.

Doussau, F., and Augustine, G.J. (2000). The actin cytoskeleton and neurotransmitter release: an overview. *Biochimie* 82, 353-363.

Doussau, F., Gasman, S., Humeau, Y., Vitiello, F., Popoff, M., Boquet, P., Bader, M.F., and Poulain, B. (2000). A Rho-related GTPase is involved in Ca(2+)-dependent neurotransmitter exocytosis. *J Biol Chem* 275, 7764-7770.

Dransart, E., Olofsson, B., and Cherfils, J. (2005). RhoGDI revisited: novel roles in Rho regulation. *Traffic* 6, 957-966.

Dumitrescu Pene, T., Rose, S.D., Lejen, T., Marcu, M.G., and Trifaro, J.M. (2005). Expression of various scinderin domains in chromaffin cells indicates that this protein acts as a molecular switch in the control of actin filament dynamics and exocytosis. *J Neurochem* 92, 780-789.

Duncan, R.R., Greaves, J., Wiegand, U.K., Matskevich, I., Bodammer, G., Apps, D.K., Shipston, M.J., and Chow, R.H. (2003). Functional and spatial segregation of secretory vesicle pools according to vesicle age. *Nature* 422, 176-180.

E

Eckert, L.B., Repasky, G.A., Ulku, A.S., McFall, A., Zhou, H., Sartor, C.I., and Der, C.J. (2004). Involvement of Ras activation in human breast cancer cell signaling, invasion, and anoikis. *Cancer Res* 64, 4585-4592.

Egile, C., Loisel, T.P., Laurent, V., Li, R., Pantaloni, D., Sansonetti, P.J., and Carlier, M.F. (1999). Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. *J Cell Biol* 146, 1319-1332.

Eitzen, G., Wang, L., Thorngren, N., and Wickner, W. (2002). Remodeling of organelle-bound actin is required for yeast vacuole fusion. *J Cell Biol* 158, 669-679.

Elhamdani, A., Azizi, F., and Artalejo, C.R. (2006). Double patch clamp reveals that transient fusion (kiss-and-run) is a major mechanism of secretion in calf adrenal chromaffin cells: high calcium shifts the mechanism from kiss-and-run to complete fusion. *J Neurosci* 26, 3030-3036.

Elhamdani, A., Palfrey, H.C., and Artalejo, C.R. (2001). Quantal size is dependent on stimulation frequency and calcium entry in calf chromaffin cells. *Neuron* 31, 819-830.

Etienne-Manneville, S. (2004). Cdc42--the centre of polarity. *J Cell Sci* 117, 1291-1300.

Evans, L.L., Lee, A.J., Bridgman, P.C., and Mooseker, M.S. (1998). Vesicle-associated brain myosin-V can be activated to catalyze actin-based transport. *J Cell Sci* 111 (Pt 14), 2055-2066.

F

Falet, H., Hoffmeister, K.M., Neujahr, R., Italiano, J.E., Jr., Stossel, T.P., Southwick, F.S., and Hartwig, J.H. (2002). Importance of free actin filament barbed ends for Arp2/3 complex function in platelets and fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16782-16787.

Fauchereau, F., Herbrand, U., Chafey, P., Eberth, A., Koulakoff, A., Vinet, M.C., Ahmadian, M.R., Chelly, J., and Billuart, P. (2003). The RhoGAP activity of OPHN1, a new F-actin-binding protein, is negatively controlled by its amino-terminal domain. *Mol Cell Neurosci* 23, 574-586.

Faundez, V., Horng, J.T., and Kelly, R.B. (1997). ADP ribosylation factor 1 is required for synaptic vesicle budding in PC12 cells. *J Cell Biol* 138, 505-515.

Fehrenbacher, K.L., Boldogh, I.R., and Pon, L.A. (2005). A role for Jsn1p in recruiting the Arp2/3 complex to mitochondria in budding yeast. *Mol Biol Cell* 16, 5094-5102.

Ferro-Novick, S., and Jahn, R. (1994). Vesicle fusion from yeast to man. *Nature* 370, 191-193.

Fleming, I.N., Batty, I.H., Prescott, A.R., Gray, A., Kular, G.S., Stewart, H., and Downes, C.P. (2004). Inositol phospholipids regulate the guanine-nucleotide-exchange factor Tiam1 by facilitating its binding to the plasma membrane and regulating GDP/GTP exchange on Rac1. *Biochem J* 382, 857-865.

Frantz, C., Coppola, T., and Regazzi, R. (2002). Involvement of Rho GTPases and their effectors in the secretory process of PC12 cells. *Exp Cell Res* 273, 119-126.

Fukuoka, M., Suetsugu, S., Miki, H., Fukami, K., Endo, T., and Takenawa, T. (2001). A novel neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) binding protein, WISH, induces Arp2/3 complex activation independent of Cdc42. *J Cell Biol* 152, 471-482.

Fulop, T., Radabaugh, S., and Smith, C. (2005). Activity-dependent differential transmitter release in mouse adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* 25, 7324-7332.

G

Galli, T., and Haucke, V. (2004). Cycling of synaptic vesicles: how far? How fast! *Sci STKE* 2004, re19.

Gampel, A., Parker, P.J., and Mellor, H. (1999). Regulation of epidermal growth factor receptor traffic by the small GTPase rhoB. *Curr Biol* 9, 955-958.

Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., Hubert, P., Aunis, D., and Bader, M.F. (1998). Identification of a potential effector pathway for the trimeric Go protein associated with secretory granules. Go stimulates a granule-bound phosphatidylinositol 4-kinase by activating RhoA in chromaffin cells. *J Biol Chem* 273, 16913-16920.

Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., Popoff, M.R., Aunis, D., and Bader, M.F. (1997). Trimeric G proteins control exocytosis in chromaffin cells. Go regulates the peripheral actin network and catecholamine secretion by a mechanism involving the small GTP-binding protein Rho. *J Biol Chem* 272, 20564-20571.

Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., Popoff, M.R., Aunis, D., and Bader, M.F. (1999). Involvement of Rho GTPases in calcium-regulated exocytosis from adrenal chromaffin cells. *J Cell Sci* 112 (Pt 24), 4763-4771.

Gasman, S., Kalaidzidis, Y., and Zerial, M. (2003). RhoD regulates endosome dynamics through Diaphanous-related Formin and Src tyrosine kinase. *Nat Cell Biol* 5, 195-204.

Gerke, V., Creutz, C.E., and Moss, S.E. (2005). Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 449-461.

Gong, L.W., Di Paolo, G., Diaz, E., Cestra, G., Diaz, M.E., Lindau, M., De Camilli, P., and Toomre, D. (2005). Phosphatidylinositol phosphate kinase type I gamma regulates dynamics of large dense-core vesicle fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5204-5209.

Gorvel, J.P., Chang, T.C., Boretto, J., Azuma, T., and Chavrier, P. (1998). Differential properties of D4/LyGDI versus RhoGDI: phosphorylation and rho GTPase selectivity. *FEBS Lett* 422, 269-273.

Greene, L.A., and Tischler, A.S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 2424-2428.

Groysman, M., Hornstein, I., Alcover, A., and Katzav, S. (2002). Vav1 and Ly-GDI two regulators of Rho GTPases, function cooperatively as signal transducers in T cell antigen receptor-induced pathways. *J Biol Chem* 277, 50121-50130.

Guinamard, R., Aspenstrom, P., Fougereau, M., Chavrier, P., and Guillemot, J.C. (1998). Tyrosine phosphorylation of the Wiskott-Aldrich syndrome protein by Lyn and Btk is regulated by CDC42. *FEBS Lett* 434, 431-436.

Guo, W., Tamanoi, F., and Novick, P. (2001). Spatial regulation of the exocyst complex by Rho1 GTPase. *Nat Cell Biol* 3, 353-360.

Gut, A., Kiraly, C.E., Fukuda, M., Mikoshiba, K., Wollheim, C.B., and Lang, J. (2001). Expression and localisation of synaptotagmin isoforms in endocrine beta-cells: their function in insulin exocytosis. *J Cell Sci* 114, 1709-1716.

H

Halpain, S. (2003). Actin in a supporting role. *Nat Neurosci* 6, 101-102.

Han, X., and Jackson, M.B. (2006). Structural transitions in the synaptic SNARE complex during Ca²⁺-triggered exocytosis. *J Cell Biol* 172, 281-293.

Harata, N.C., Aravanis, A.M., and Tsien, R.W. (2006a). Kiss-and-run and full-collapse fusion as modes of exo-endocytosis in neurosecretion. *J Neurochem* 97, 1546-1570.

Harata, N.C., Choi, S., Pyle, J.L., Aravanis, A.M., and Tsien, R.W. (2006b). Frequency-dependent kinetics and prevalence of kiss-and-run and reuse at hippocampal synapses studied with novel quenching methods. *Neuron* 49, 243-256.

Harborth, J., Elbashir, S.M., Bechert, K., Tuschl, T., and Weber, K. (2001). Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci* 114, 4557-4565.

Hart, M.J., Callow, M.G., Souza, B., and Polakis, P. (1996). IQGAP1, a calmodulin-binding protein with a rasGAP-related domain, is a potential effector for cdc42Hs. *Embo J* 15, 2997-3005.

Hart, M.J., Eva, A., Evans, T., Aaronson, S.A., and Cerione, R.A. (1991). Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the dbl oncogene product. *Nature* 354, 311-314.

Hayes, M.J., Rescher, U., Gerke, V., and Moss, S.E. (2004). Annexin-actin interactions. *Traffic* 5, 571-576.

Hayes, M.J., Shao, D., Bailly, M., and Moss, S.E. (2006). Regulation of actin dynamics by annexin 2. *Embo J* 25, 1816-1826.

Heuser, J.E., and Reese, T.S. (1973). Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* 57, 315-344.

- Higgs, H.N., and Pollard, T.D. (2000). Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. *J Cell Biol* 150, 1311-1320.
- Hirokawa, N., Sobue, K., Kanda, K., Harada, A., and Yorifuji, H. (1989). The cytoskeletal architecture of the presynaptic terminal and molecular structure of synapsin 1. *J Cell Biol* 108, 111-126.
- Ho, H.Y., Rohatgi, R., Lebensohn, A.M., Le, M., Li, J., Gygi, S.P., and Kirschner, M.W. (2004). Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex. *Cell* 118, 203-216.
- Holz, R.W., Hlubek, M.D., Sorensen, S.D., Fisher, S.K., Balla, T., Ozaki, S., Prestwich, G.D., Stuenkel, E.L., and Bittner, M.A. (2000). A pleckstrin homology domain specific for phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PtdIns-4,5-P2) and fused to green fluorescent protein identifies plasma membrane PtdIns-4,5-P2 as being important in exocytosis. *J Biol Chem* 275, 17878-17885.
- Hong-Geller, E., and Cerione, R.A. (2000). Cdc42 and Rac stimulate exocytosis of secretory granules by activating the IP(3)/calcium pathway in RBL-2H3 mast cells. *J Cell Biol* 148, 481-494.
- Hsu, S.C., TerBush, D., Abraham, M., and Guo, W. (2004). The exocyst complex in polarized exocytosis. *Int Rev Cytol* 233, 243-265.
- Huang, J., Hsia, S.H., Imamura, T., Usui, I., and Olefsky, J.M. (2004). Annexin II is a thiazolidinedione-responsive gene involved in insulin-induced glucose transporter isoform 4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* 145, 1579-1586.
- Huh, Y.H., Bahk, S.J., Ghee, J.Y., and Yoo, S.H. (2005). Subcellular distribution of chromogranins A and B in bovine adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett* 579, 5145-5151.
- Huh, Y.H., Jeon, S.H., and Yoo, S.H. (2003). Chromogranin B-induced secretory granule biogenesis: comparison with the similar role of chromogranin A. *J Biol Chem* 278, 40581-40589.
- Humeau, Y. (2002) *Trafic vésiculaire synaptique et exocytose des neurotransmetteurs*. Thèse de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg.
- Humeau, Y., Popoff, M.R., Kojima, H., Doussau, F., and Poulain, B. (2002). Rac GTPase plays an essential role in exocytosis by controlling the fusion competence of release sites. *J Neurosci* 22, 7968-7981.
- Hunt, J.M., Bommert, K., Charlton, M.P., Kistner, A., Habermann, E., Augustine, G.J., and Betz, H. (1994). A post-docking role for synaptobrevin in synaptic vesicle fusion. *Neuron* 12, 1269-1279.
- Hussain, N.K., Jenna, S., Glogauer, M., Quinn, C.C., Wasiak, S., Guipponi, M., Antonarakis, S.E., Kay, B.K., Stossel, T.P., Lamarche-Vane, N., and McPherson, P.S. (2001). Endocytic protein intersectin-1 regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP. *Nat Cell Biol* 3, 927-932.
- Hussain, N.K., Yamabhai, M., Ramjaun, A.R., Guy, A.M., Baranes, D., O'Bryan, J.P., Der, C.J., Kay, B.K., and McPherson, P.S. (1999). Splice variants of intersectin are components of the endocytic machinery in neurons and nonneuronal cells. *J Biol Chem* 274, 15671-15677.

I

- Imai, K., Nonoyama, S., and Ochs, H.D. (2003). WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) gene mutations and phenotype. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 3, 427-436.
- Insall, R., Muller-Taubenberger, A., Machesky, L., Kohler, J., Simmeth, E., Atkinson, S.J., Weber, I., and Gerisch, G. (2001). Dynamics of the Dictyostelium Arp2/3 complex in endocytosis, cytokinesis, and chemotaxis. *Cell Motil Cytoskeleton* 50, 115-128.
- Irie, F., and Yamaguchi, Y. (2002). EphB receptors regulate dendritic spine development via intersectin, Cdc42 and N-WASP. *Nat Neurosci* 5, 1117-1118.

Itoh, T., and De Camilli, P. (2006). BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. *Biochim Biophys Acta* 1761, 897-912.

J

Jackson, M.B., and Chapman, E.R. (2006). Fusion pores and fusion machines in Ca²⁺-triggered exocytosis. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 35, 135-160.

Jacob, R., Heine, M., Eikemeyer, J., Frerker, N., Zimmer, K.P., Rescher, U., Gerke, V., and Naim, H.Y. (2004). Annexin II is required for apical transport in polarized epithelial cells. *J Biol Chem* 279, 3680-3684.

Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 247-269.

Jahn, R., Lang, T., and Sudhof, T.C. (2003). Membrane fusion. *Cell* 112, 519-533.

Jaiswal, J.K., Chakrabarti, S., Andrews, N.W., and Simon, S.M. (2004). Synaptotagmin VII restricts fusion pore expansion during lysosomal exocytosis. *PLoS Biol* 2, E233.

Jenna, S., Hussain, N.K., Danek, E.I., Triki, I., Wasiak, S., McPherson, P.S., and Lamarche-Vane, N. (2002). The activity of the GTPase-activating protein CdGAP is regulated by the endocytic protein intersectin. *J Biol Chem* 277, 6366-6373.

Jiang, Z.Y., Chawla, A., Bose, A., Way, M., and Czech, M.P. (2002). A phosphatidylinositol 3-kinase-independent insulin signaling pathway to N-WASP/Arp2/3/F-actin required for GLUT4 glucose transporter recycling. *J Biol Chem* 277, 509-515.

Jordens, I., Marsman, M., Kuijl, C., and Neefjes, J. (2005). Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic* 6, 1070-1077.

K

Kabsch, W., and Holmes, K.C. (1995). The actin fold. *Faseb J* 9, 167-174.

Kaneko, T., Maeda, A., Takefuji, M., Aoyama, H., Nakayama, M., Kawabata, S., Kawano, Y., Iwamatsu, A., Amano, M., and Kaibuchi, K. (2005). Rho mediates endocytosis of epidermal growth factor receptor through phosphorylation of endophilin A1 by Rho-kinase. *Genes Cells* 10, 973-987.

Karnoub, A.E., WorthyLake, D.K., Rossman, K.L., Pruitt, W.M., Campbell, S.L., Sondek, J., and Der, C.J. (2001). Molecular basis for Rac1 recognition by guanine nucleotide exchange factors. *Nat Struct Biol* 8, 1037-1041.

Katz, L., Hanson, P.I., Heuser, J.E., and Brennwald, P. (1998). Genetic and morphological analyses reveal a critical interaction between the C-termini of two SNARE proteins and a parallel four helical arrangement for the exocytic SNARE complex. *Embo J* 17, 6200-6209.

Kesavapany, S., Amin, N., Zheng, Y.L., Nijhara, R., Jaffe, H., Sihag, R., Gutkind, J.S., Takahashi, S., Kulkarni, A., Grant, P., and Pant, H.C. (2004). p35/cyclin-dependent kinase 5 phosphorylation of ras guanine nucleotide releasing factor 2 (RasGRF2) mediates Rac-dependent Extracellular Signal-regulated kinase 1/2 activity, altering RasGRF2 and microtubule-associated protein 1b distribution in neurons. *J Neurosci* 24, 4421-4431.

Kessels, M.M., and Qualmann, B. (2002). Syndapins integrate N-WASP in receptor-mediated endocytosis. *Embo J* 21, 6083-6094.

Kim, C.H., and Lisman, J.E. (1999). A role of actin filament in synaptic transmission and long-term potentiation. *J Neurosci* 19, 4314-4324.

Kim, T., Gondre-Lewis, M.C., Arnaoutova, I., and Loh, Y.P. (2006). Dense-core secretory granule biogenesis. *Physiology (Bethesda)* 21, 124-133.

Kiyono, M., Kaziro, Y., and Satoh, T. (2000). Induction of rac-guanine nucleotide exchange activity of Ras-GRF1/CDC25(Mm) following phosphorylation by the nonreceptor tyrosine kinase Src. *J Biol Chem* 275, 5441-5446.

Kjeken, R., Egeberg, M., Habermann, A., Kuehnel, M., Peyron, P., Floetenmeyer, M., Walther, P., Jahraus, A., Defacque, H., Kuznetsov, S.A., and Griffiths, G. (2004). Fusion between phagosomes, early and late endosomes: a role for actin in fusion between late, but not early endocytic organelles. *Mol Biol Cell* 15, 345-358.

Koushika, S.P., Richmond, J.E., Hadwiger, G., Weimer, R.M., Jorgensen, E.M., and Nonet, M.L. (2001). A post-docking role for active zone protein Rim. *Nat Neurosci* 4, 997-1005.

Kovacs, E.M., Goodwin, M., Ali, R.G., Paterson, A.D., and Yap, A.S. (2002). Cadherin-directed actin assembly: E-cadherin physically associates with the Arp2/3 complex to direct actin assembly in nascent adhesive contacts. *Curr Biol* 12, 379-382.

Kovar, D.R. (2006). Arp2/3 ATP hydrolysis: to branch or to debranch? *Nat Cell Biol* 8, 783-785.

Kowluru, A., Li, G., Rabaglia, M.E., Segu, V.B., Hofmann, F., Aktories, K., and Metz, S.A. (1997). Evidence for differential roles of the Rho subfamily of GTP-binding proteins in glucose- and calcium-induced insulin secretion from pancreatic beta cells. *Biochem Pharmacol* 54, 1097-1108.

L

Lafont, F., Verkade, P., Galli, T., Wimmer, C., Louvard, D., and Simons, K. (1999). Raft association of SNAP receptors acting in apical trafficking in Madin-Darby canine kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3734-3738.

Lamaze, C., Chuang, T.H., Terlecky, L.J., Bokoch, G.M., and Schmid, S.L. (1996). Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac. *Nature* 382, 177-179.

Landis, D.M., Hall, A.K., Weinstein, L.A., and Reese, T.S. (1988). The organization of cytoplasm at the presynaptic active zone of a central nervous system synapse. *Neuron* 1, 201-209.

Landis, D.M., and Reese, T.S. (1983). Cytoplasmic organization in cerebellar dendritic spines. *J Cell Biol* 97, 1169-1178.

Lang, T., Wacker, I., Wunderlich, I., Rohrbach, A., Giese, G., Soldati, T., and Almers, W. (2000). Role of actin cortex in the subplasmalemmal transport of secretory granules in PC-12 cells. *Biophys J* 78, 2863-2877.

Langley, O.K., Perrin, D., and Aunis, D. (1986). Alpha-fodrin in the adrenal gland: localization by immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* 34, 517-525.

Lee, R.W., and Trifaro, J.M. (1981). Characterization of anti-actin antibodies and their use in immunocytochemical studies on the localization of actin in adrenal chromaffin cells in culture. *Neuroscience* 6, 2087-2108.

Li, G., Rungger-Brandle, E., Just, I., Jonas, J.C., Aktories, K., and Wollheim, C.B. (1994). Effect of disruption of actin filaments by Clostridium botulinum C2 toxin on insulin secretion in HIT-T15 cells and pancreatic islets. *Mol Biol Cell* 5, 1199-1213.

Li, H.Y., Cao, K., and Zheng, Y. (2003a). Ran in the spindle checkpoint: a new function for a versatile GTPase. *Trends Cell Biol* 13, 553-557.

Li, L., and Chin, L.S. (2003). The molecular machinery of synaptic vesicle exocytosis. *Cell Mol Life Sci* 60, 942-960.

Li, Q., Ho, C.S., Marinescu, V., Bhatti, H., Bokoch, G.M., Ernst, S.A., Holz, R.W., and Stuenkel, E.L. (2003b). Facilitation of Ca(2+)-dependent exocytosis by Rac1-GTPase in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 550, 431-445.

Li, R. (1997). Bee1, a yeast protein with homology to Wiskott-Aldrich syndrome protein, is critical for the assembly of cortical actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 136, 649-658.

Ligeti, E., Dagher, M.C., Hernandez, S.E., Koleske, A.J., and Settleman, J. (2004). Phospholipids can switch the GTPase substrate preference of a GTPase-activating protein. *J Biol Chem* 279, 5055-5058.

Lippe, R., Miaczynska, M., Rybin, V., Runge, A., and Zerial, M. (2001). Functional synergy between Rab5 effector Rabaptin-5 and exchange factor Rabex-5 when physically associated in a complex. *Mol Biol Cell* 12, 2219-2228.

Liu, K., and Li, G. (1998). Catalytic domain of the p120 Ras GAP binds to RAB5 and stimulates its GTPase activity. *J Biol Chem* 273, 10087-10090.

Lu, H., Kremontsova, E.B., and Trybus, K.M. (2006). Regulation of Myosin v processivity by calcium at the single molecule level. *J Biol Chem* 281, 31987-31994.

Luna, A., Matas, O.B., Martinez-Menarguez, J.A., Mato, E., Duran, J.M., Ballesta, J., Way, M., and Egea, G. (2002). Regulation of protein transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum by CDC42 and N-WASP. *Mol Biol Cell* 13, 866-879.

M

Madania, A., Dumoulin, P., Grava, S., Kitamoto, H., Schärer-Brodbeck, C., Soulard, A., Moreau, V., and Winsor, B. (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* homologue of human Wiskott-Aldrich syndrome protein Las17p interacts with the Arp2/3 complex. *Mol Biol Cell* 10, 3521-3538.

Maekawa, S., Iino, S., and Miyata, S. (2003). Molecular characterization of the detergent-insoluble cholesterol-rich membrane microdomain (raft) of the central nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1610, 261-270.

Majstorovich, S., Zhang, J., Nicholson-Dykstra, S., Linder, S., Friedrich, W., Siminovich, K.A., and Higgs, H.N. (2004). Lymphocyte microvilli are dynamic, actin-dependent structures that do not require Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) for their morphology. *Blood* 104, 1396-1403.

Malacombe, M., Bader, M.F., and Gasman, S. (2006a). Exocytosis in neuroendocrine cells: New tasks for actin. *Biochim Biophys Acta*.

Malacombe, M., Ceridono, M., Calco, V., Chasserot-Golaz, S., McPherson, P.S., Bader, M.F., and Gasman, S. (2006b). Intersectin-1L nucleotide exchange factor regulates secretory granule exocytosis by activating Cdc42. *Embo J* 25, 3494-3503.

Malecz, N., McCabe, P.C., Spaargaren, C., Qiu, R., Chuang, Y., and Symons, M. (2000). Synaptojanin 2, a novel Rac1 effector that regulates clathrin-mediated endocytosis. *Curr Biol* 10, 1383-1386.

Markosyan, R.M., Cohen, F.S., and Melikyan, G.B. (2000). The lipid-anchored ectodomain of influenza virus hemagglutinin (GPI-HA) is capable of inducing nonenlarging fusion pores. *Mol Biol Cell* 11, 1143-1152.

Marqueze, B., Berton, F., and Seagar, M. (2000). Synaptotagmins in membrane traffic: which vesicles do the tagmins tag? *Biochimie* 82, 409-420.

Massol, P., Montcourrier, P., Guillemot, J.C., and Chavrier, P. (1998). Fc receptor-mediated phagocytosis requires CDC42 and Rac1. *Embo J* 17, 6219-6229.

Matas, O.B., Martinez-Menarguez, J.A., and Egea, G. (2004). Association of Cdc42/N-WASP/Arp2/3 signaling pathway with Golgi membranes. *Traffic* 5, 838-846.

Matter, K., Dreyer, F., and Aktories, K. (1989). Actin involvement in exocytosis from PC12 cells: studies on the influence of botulinum C2 toxin on stimulated noradrenaline release. *J Neurochem* 52, 370-376.

- McManus, M.T., and Sharp, P.A. (2002). Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* 3, 737-747.
- Medalia, O., Weber, I., Frangakis, A.S., Nicastro, D., Gerisch, G., and Baumeister, W. (2002). Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography. *Science* 298, 1209-1213.
- Meldolesi, J., Chiergatti, E., and Luisa Malosio, M. (2004). Requirements for the identification of dense-core granules. *Trends Cell Biol* 14, 13-19.
- Meller, N., Irani-Tehrani, M., Ratnikov, B.I., Paschal, B.M., and Schwartz, M.A. (2004). The novel Cdc42 guanine nucleotide exchange factor, zizimin1, dimerizes via the Cdc42-binding CZH2 domain. *J Biol Chem* 279, 37470-37476.
- Meller, N., Merlot, S., and Guda, C. (2005). CZH proteins: a new family of Rho-GEFs. *J Cell Sci* 118, 4937-4946.
- Merrifield, C.J., Perrais, D., and Zenisek, D. (2005). Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells. *Cell* 121, 593-606.
- Merrifield, C.J., Qualmann, B., Kessels, M.M., and Almers, W. (2004). Neural Wiskott Aldrich Syndrome Protein (N-WASP) and the Arp2/3 complex are recruited to sites of clathrin-mediated endocytosis in cultured fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 83, 13-18.
- Merrifield, C.J., Rescher, U., Almers, W., Proust, J., Gerke, V., Sechi, A.S., and Moss, S.E. (2001). Annexin 2 has an essential role in actin-based macropinocytic rocketing. *Curr Biol* 11, 1136-1141.
- Michiels, F., Stam, J.C., Hordijk, P.L., van der Kammen, R.A., Ruuls-Van Stalle, L., Feltkamp, C.A., and Collard, J.G. (1997). Regulated membrane localization of Tiam1, mediated by the NH2-terminal pleckstrin homology domain, is required for Rac-dependent membrane ruffling and C-Jun NH2-terminal kinase activation. *J Cell Biol* 137, 387-398.
- Miki, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (1998). WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *Embo J* 17, 6932-6941.
- Millard, T.H., Sharp, S.J., and Machesky, L.M. (2004). Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem J* 380, 1-17.
- Milosevic, I., Sorensen, J.B., Lang, T., Krauss, M., Nagy, G., Haucke, V., Jahn, R., and Neher, E. (2005). Plasmalemmal phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate level regulates the releasable vesicle pool size in chromaffin cells. *J Neurosci* 25, 2557-2565.
- Miyamoto, S., Funatsu, T., Ishiwata, S., and Fujime, S. (1993). Changes in mobility of chromaffin granules in actin network with its assembly and Ca(2+)-dependent disassembly by gelsolin. *Biophys J* 64, 1139-1149.
- Molinete, M., Irminger, J.C., Tooze, S.A., and Halban, P.A. (2000). Trafficking/sorting and granule biogenesis in the beta-cell. *Semin Cell Dev Biol* 11, 243-251.
- Morales, M., Colicos, M.A., and Goda, Y. (2000). Actin-dependent regulation of neurotransmitter release at central synapses. *Neuron* 27, 539-550.
- Morciano, M., Burre, J., Corvey, C., Karas, M., Zimmermann, H., and Volkandt, W. (2005). Immunoprecipitation of two synaptic vesicle pools from synaptosomes: a proteomics analysis. *J Neurochem* 95, 1732-1745.
- Morone, N., Fujiwara, T., Murase, K., Kasai, R.S., Ike, H., Yuasa, S., Usukura, J., and Kusumi, A. (2006). Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. *J Cell Biol* 174, 851-862.
- Moskalenko, S., Henry, D.O., Rosse, C., Mirey, G., Camonis, J.H., and White, M.A. (2002). The exocyst is a Ral effector complex. *Nat Cell Biol* 4, 66-72.

Mullins, R.D., Stafford, W.F., and Pollard, T.D. (1997). Structure, subunit topology, and actin-binding activity of the Arp2/3 complex from *Acanthamoeba*. *J Cell Biol* 136, 331-343.

N

Nakata, T., and Hirokawa, N. (1992). Organization of cortical cytoskeleton of cultured chromaffin cells and involvement in secretion as revealed by quick-freeze, deep-etching, and double-label immunoelectron microscopy. *J Neurosci* 12, 2186-2197.

Neco, P., Gil, A., Del Mar Frances, M., Viniegra, S., and Gutierrez, L.M. (2002). The role of myosin in vesicle transport during bovine chromaffin cell secretion. *Biochem J* 368, 405-413.

Neco, P., Giner, D., del Mar Frances, M., Viniegra, S., and Gutierrez, L.M. (2003). Differential participation of actin- and tubulin-based vesicle transport systems during secretion in bovine chromaffin cells. *Eur J Neurosci* 18, 733-742.

Neco, P., Giner, D., Viniegra, S., Borges, R., Villarroel, A., and Gutierrez, L.M. (2004). New roles of myosin II during vesicle transport and fusion in chromaffin cells. *J Biol Chem* 279, 27450-27457.

Nemoto, T., Kojima, T., Oshima, A., Bito, H., and Kasai, H. (2004). Stabilization of exocytosis by dynamic F-actin coating of zymogen granules in pancreatic acini. *J Biol Chem* 279, 37544-37550.

Nevins, A.K., and Thurmond, D.C. (2005). A direct interaction between Cdc42 and vesicle-associated membrane protein 2 regulates SNARE-dependent insulin exocytosis. *J Biol Chem* 280, 1944-1952.

Nguyen, H., and Higuchi, H. (2005). Motility of myosin V regulated by the dissociation of single calmodulin. *Nat Struct Mol Biol* 12, 127-132.

Nie, Z., Hirsch, D.S., and Randazzo, P.A. (2003). Arf and its many interactors. *Curr Opin Cell Biol* 15, 396-404.

Niedergang, F., and Chavrier, P. (2005). Regulation of phagocytosis by Rho GTPases. *Curr Top Microbiol Immunol* 291, 43-60.

O

Oheim, M., and Stuhmer, W. (2000). Tracking chromaffin granules on their way through the actin cortex. *Eur Biophys J* 29, 67-89.

Okamoto, M., Schoch, S., and Sudhof, T.C. (1999). EHS1/intersectin, a protein that contains EH and SH3 domains and binds to dynamin and SNAP-25. A protein connection between exocytosis and endocytosis? *J Biol Chem* 274, 18446-18454.

Orci, L., Gabbay, K.H., and Malaisse, W.J. (1972). Pancreatic beta-cell web: its possible role in insulin secretion. *Science* 175, 1128-1130.

Orci, L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Louvard, D., and Perrelet, A. (1985). Clathrin-immunoreactive sites in the Golgi apparatus are concentrated at the trans pole in polypeptide hormone-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 5385-5389.

Orci, L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Madsen, O., Perrelet, A., Vassalli, J.D., and Anderson, R.G. (1986). Conversion of proinsulin to insulin occurs coordinately with acidification of maturing secretory vesicles. *J Cell Biol* 103, 2273-2281.

P

Paduch, M., Jelen, F., and Otlewski, J. (2001). Structure of small G proteins and their regulators. *Acta Biochim Pol* 48, 829-850.

- Panchal, S.C., Kaiser, D.A., Torres, E., Pollard, T.D., and Rosen, M.K. (2003). A conserved amphipathic helix in WASP/Scar proteins is essential for activation of Arp2/3 complex. *Nat Struct Biol* 10, 591-598.
- Park, H.S., Lee, S.H., Park, D., Lee, J.S., Ryu, S.H., Lee, W.J., Rhee, S.G., and Bae, Y.S. (2004). Sequential activation of phosphatidylinositol 3-kinase, beta Pix, Rac1, and Nox1 in growth factor-induced production of H₂O₂. *Mol Cell Biol* 24, 4384-4394.
- Parsons, T.D., Coorsen, J.R., Horstmann, H., and Almers, W. (1995). Docked granules, the exocytic burst, and the need for ATP hydrolysis in endocrine cells. *Neuron* 15, 1085-1096.
- Patzak, A., Bock, G., Fischer-Colbrie, R., Schauenstein, K., Schmidt, W., Lingg, G., and Winkler, H. (1984). Exocytotic exposure and retrieval of membrane antigens of chromaffin granules: quantitative evaluation of immunofluorescence on the surface of chromaffin cells. *J Cell Biol* 98, 1817-1824.
- Pemberton, L.F., and Paschal, B.M. (2005). Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic* 6, 187-198.
- Pendleton, A., and Koffer, A. (2001). Effects of latrunculin reveal requirements for the actin cytoskeleton during secretion from mast cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 48, 37-51.
- Perrais, D., and Merrifield, C.J. (2005). Dynamics of endocytic vesicle creation. *Dev Cell* 9, 581-592.
- Peters, C., Bayer, M.J., Buhler, S., Andersen, J.S., Mann, M., and Mayer, A. (2001). Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature* 409, 581-588.
- Poch, O., and Winsor, B. (1997). Who's who among the *Saccharomyces cerevisiae* actin-related proteins? A classification and nomenclature proposal for a large family. *Yeast* 13, 1053-1058.
- Poisner, A.M., and Bernstein, J. (1971). A possible role of microtubules in catecholamine release from the adrenal medulla: effect of colchicine, vinca alkaloids and deuterium oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 177, 102-108.
- Prekeris, R., and Terrian, D.M. (1997). Brain myosin V is a synaptic vesicle-associated motor protein: evidence for a Ca²⁺-dependent interaction with the synaptobrevin-synaptophysin complex. *J Cell Biol* 137, 1589-1601.

Q

- Qualmann, B., Kessels, M.M., and Kelly, R.B. (2000). Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 150, F111-116.
- Qualmann, B., and Mellor, H. (2003). Regulation of endocytic traffic by Rho GTPases. *Biochem J* 371, 233-241.
- Qualmann, B., Roos, J., DiGregorio, P.J., and Kelly, R.B. (1999). Syndapin I, a synaptic dynamin-binding protein that associates with the neural Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Mol Biol Cell* 10, 501-513.

R

- Raftopoulou, M., and Hall, A. (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* 265, 23-32.
- Razinkov, V.I., Melikyan, G.B., and Cohen, F.S. (1999). Hemifusion between cells expressing hemagglutinin of influenza virus and planar membranes can precede the formation of fusion pores that subsequently fully enlarge. *Biophys J* 77, 3144-3151.
- Reese, C., Heise, F., and Mayer, A. (2005). Trans-SNARE pairing can precede a hemifusion intermediate in intracellular membrane fusion. *Nature* 436, 410-414.
- Rettig, J., and Neher, E. (2002). Emerging roles of presynaptic proteins in Ca⁺⁺-triggered exocytosis. *Science* 298, 781-785.

- Ridley, A.J. (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol*.
- Ridley, A.J., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* *70*, 389-399.
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* *70*, 401-410.
- Riento, K., and Ridley, A.J. (2003). Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* *4*, 446-456.
- Ringstad, N., Gad, H., Low, P., Di Paolo, G., Brodin, L., Shupliakov, O., and De Camilli, P. (1999). Endophilin/SH3p4 is required for the transition from early to late stages in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* *24*, 143-154.
- Rizzoli, S.O., and Betz, W.J. (2005). Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci* *6*, 57-69.
- Robbe, K., Otto-Bruc, A., Chardin, P., and Antonny, B. (2003). Dissociation of GDP dissociation inhibitor and membrane translocation are required for efficient activation of Rac by the Dbl homology-pleckstrin homology region of Tiam. *J Biol Chem* *278*, 4756-4762.
- Rogers, S.L., Tint, I.S., Fanapour, P.C., and Gelfand, V.I. (1997). Regulated bidirectional motility of melanophore pigment granules along microtubules in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 3720-3725.
- Rohatgi, R., Ho, H.Y., and Kirschner, M.W. (2000). Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Cell Biol* *150*, 1299-1310.
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., and Kirschner, M.W. (1999). The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* *97*, 221-231.
- Rose, S.D., Lejen, T., Casaletti, L., Larson, R.E., Pene, T.D., and Trifaro, J.M. (2003). Myosins II and V in chromaffin cells: myosin V is a chromaffin vesicle molecular motor involved in secretion. *J Neurochem* *85*, 287-298.
- Rossman, K.L., and Campbell, S.L. (2000). Bacterial expressed DH and DH/PH domains. *Methods Enzymol* *325*, 25-38.
- Rossman, K.L., Der, C.J., and Sondek, J. (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* *6*, 167-180.
- Rudolf, R., Kogel, T., Kuznetsov, S.A., Salm, T., Schlicker, O., Hellwig, A., Hammer, J.A., 3rd, and Gerdes, H.H. (2003). Myosin Va facilitates the distribution of secretory granules in the F-actin rich cortex of PC12 cells. *J Cell Sci* *116*, 1339-1348.
- Rudolf, R., Salm, T., Rustom, A., and Gerdes, H.H. (2001). Dynamics of immature secretory granules: role of cytoskeletal elements during transport, cortical restriction, and F-actin-dependent tethering. *Mol Biol Cell* *12*, 1353-1365.
- Russo, C., Gao, Y., Mancini, P., Vanni, C., Porotto, M., Falasca, M., Torrisi, M.R., Zheng, Y., and Eva, A. (2001). Modulation of oncogenic DBL activity by phosphoinositol phosphate binding to pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* *276*, 19524-19531.

S

- Sakaba, T., and Neher, E. (2003). Involvement of actin polymerization in vesicle recruitment at the calyx of Held synapse. *J Neurosci* *23*, 837-846.

- Sander, E.E., ten Klooster, J.P., van Delft, S., van der Kammen, R.A., and Collard, J.G. (1999). Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol* 147, 1009-1022.
- Sankaranarayanan, S., Atluri, P.P., and Ryan, T.A. (2003). Actin has a molecular scaffolding, not propulsive, role in presynaptic function. *Nat Neurosci* 6, 127-135.
- Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Polverino de Laureto, P., DasGupta, B.R., and Montecucco, C. (1992). Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* 359, 832-835.
- Schiavo, G., Shone, C.C., Rossetto, O., Alexander, F.C., and Montecucco, C. (1993). Botulinum neurotoxin serotype F is a zinc endopeptidase specific for VAMP/synaptobrevin. *J Biol Chem* 268, 11516-11519.
- Schmidt, A., and Hall, A. (2002a). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16, 1587-1609.
- Schmidt, A., and Hall, A. (2002b). The Rho exchange factor Net1 is regulated by nuclear sequestration. *J Biol Chem* 277, 14581-14588.
- Schoch, S., Castillo, P.E., Jo, T., Mukherjee, K., Geppert, M., Wang, Y., Schmitz, F., Malenka, R.C., and Sudhof, T.C. (2002). RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone. *Nature* 415, 321-326.
- Schwartz, M. (2004). Rho signalling at a glance. *J Cell Sci* 117, 5457-5458.
- Segawa, A., and Yamashina, S. (1989). Roles of microfilaments in exocytosis: a new hypothesis. *Cell Struct Funct* 14, 531-544.
- Senda, T., Fujita, H., Ban, T., Zhong, C., Ishimura, K., Kanda, K., and Sobue, K. (1989). Ultrastructural and immunocytochemical studies on the cytoskeleton in the anterior pituitary of rats, with special regard to the relationship between actin filaments and secretory granules. *Cell Tissue Res* 258, 25-30.
- Shamah, S.M., Lin, M.Z., Goldberg, J.L., Estrach, S., Sahin, M., Hu, L., Bazalakova, M., Neve, R.L., Corfas, G., Debant, A., and Greenberg, M.E. (2001). EphA receptors regulate growth cone dynamics through the novel guanine nucleotide exchange factor ephexin. *Cell* 105, 233-244.
- Shimada, Y., Gulli, M.P., and Peter, M. (2000). Nuclear sequestration of the exchange factor Cdc24 by Far1 regulates cell polarity during yeast mating. *Nat Cell Biol* 2, 117-124.
- Shupliakov, O., Bloom, O., Gustafsson, J.S., Kjaerulff, O., Low, P., Tomilin, N., Pieribone, V.A., Greengard, P., and Brodin, L. (2002). Impaired recycling of synaptic vesicles after acute perturbation of the presynaptic actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14476-14481.
- Shupliakov, O., Low, P., Grabs, D., Gad, H., Chen, H., David, C., Takei, K., De Camilli, P., and Brodin, L. (1997). Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions. *Science* 276, 259-263.
- Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31-39.
- Snyder, J.T., Rossman, K.L., Baumeister, M.A., Pruitt, W.M., Siderovski, D.P., Der, C.J., Lemmon, M.A., and Sondek, J. (2001). Quantitative analysis of the effect of phosphoinositide interactions on the function of Dbl family proteins. *J Biol Chem* 276, 45868-45875.
- Sokac, A.M., and Bement, W.M. (2006). Kiss-and-coat and compartment mixing: coupling exocytosis to signal generation and local actin assembly. *Mol Biol Cell* 17, 1495-1502.
- Sokac, A.M., Co, C., Taunton, J., and Bement, W. (2003). Cdc42-dependent actin polymerization during compensatory endocytosis in *Xenopus* eggs. *Nat Cell Biol* 5, 727-732.

Sollner, T., Bennett, M.K., Whiteheart, S.W., Scheller, R.H., and Rothman, J.E. (1993a). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75, 409-418.

Sollner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., and Rothman, J.E. (1993b). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362, 318-324.

Sontag, J.M., Aunis, D., and Bader, M.F. (1988). Peripheral actin filaments control calcium-mediated catecholamine release from streptolysin-O-permeabilized chromaffin cells. *Eur J Cell Biol* 46, 316-326.

Sorensen, J.B. (2004). Formation, stabilisation and fusion of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Pflugers Arch* 448, 347-362.

Sorensen, J.B., Wiederhold, K., Muller, E.M., Milosevic, I., Nagy, G., de Groot, B.L., Grubmuller, H., and Fasshauer, D. (2006). Sequential N- to C-terminal SNARE complex assembly drives priming and fusion of secretory vesicles. *Embo J* 25, 955-966.

Sorokina, E.M., and Chernoff, J. (2005). Rho-GTPases: new members, new pathways. *J Cell Biochem* 94, 225-231.

Southwick, F.S., Li, W., Zhang, F., Zeile, W.L., and Purich, D.L. (2003). Actin-based endosome and phagosome rocketing in macrophages: activation by the secretagogue antagonists lanthanum and zinc. *Cell Motil Cytoskeleton* 54, 41-55.

Spector, I., Braet, F., Shochet, N.R., and Bubb, M.R. (1999). New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton. *Microsc Res Tech* 47, 18-37.

Stradal, T.E., Rottner, K., Disanza, A., Confalonieri, S., Innocenti, M., and Scita, G. (2004). Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol* 14, 303-311.

Suetsugu, S., Hattori, M., Miki, H., Tezuka, T., Yamamoto, T., Mikoshiba, K., and Takenawa, T. (2002). Sustained activation of N-WASP through phosphorylation is essential for neurite extension. *Dev Cell* 3, 645-658.

Summers, S.A., Guebert, B.A., and Shanahan, M.F. (1996). Polyphosphoinositide inclusion in artificial lipid bilayer vesicles promotes divalent cation-dependent membrane fusion. *Biophys J* 71, 3199-3206.

Sun, L., Bittner, M.A., and Holz, R.W. (2001). Rab3a binding and secretion-enhancing domains in Rim1 are separate and unique. Studies in adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem* 276, 12911-12917.

Sutton, R.B., Fasshauer, D., Jahn, R., and Brunger, A.T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395, 347-353.

T

Takahashi, K., Sasaki, T., Mammoto, A., Hotta, I., Takaishi, K., Imamura, H., Nakano, K., Kodama, A., and Takai, Y. (1998). Interaction of radixin with Rho small G protein GDP/GTP exchange protein Dbl. *Oncogene* 16, 3279-3284.

Takenawa, T., and Miki, H. (2001). WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci* 114, 1801-1809.

Tao-Cheng, J.H., Dosemeci, A., Bressler, J.P., Brightman, M.W., and Simpson, D.L. (1995). Characterization of synaptic vesicles and related neuronal features in nerve growth factor and ras oncogene differentiated PC12 cells. *J Neurosci Res* 42, 323-334.

Taunton, J., Rowning, B.A., Coughlin, M.L., Wu, M., Moon, R.T., Mitchison, T.J., and Larabell, C.A. (2000). Actin-dependent propulsion of endosomes and lysosomes by recruitment of N-WASP. *J Cell Biol* 148, 519-530.

Tchakarov, L.E., Zhang, L., Rose, S.D., Tang, R., and Trifaro, J.M. (1998). Light and electron microscopic study of changes in the organization of the cortical actin cytoskeleton during chromaffin cell secretion. *J Histochem Cytochem* 46, 193-203.

Thurmond, D.C., Gonelle-Gispert, C., Furukawa, M., Halban, P.A., and Pessin, J.E. (2003). Glucose-stimulated insulin secretion is coupled to the interaction of actin with the t-SNARE (target membrane soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor protein) complex. *Mol Endocrinol* 17, 732-742.

Tolias, K.F., Hartwig, J.H., Ishihara, H., Shibasaki, Y., Cantley, L.C., and Carpenter, C.L. (2000). Type Ialpha phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase mediates Rac-dependent actin assembly. *Curr Biol* 10, 153-156.

Toonen, R.F., Kochubey, O., de Wit, H., Gulyas-Kovacs, A., Konijnenburg, B., Sorensen, J.B., Klingauf, J., and Verhage, M. (2006). Dissecting docking and tethering of secretory vesicles at the target membrane. *Embo J* 25, 3725-3737.

Tooze, J., and Tooze, S.A. (1986). Clathrin-coated vesicular transport of secretory proteins during the formation of ACTH-containing secretory granules in AtT20 cells. *J Cell Biol* 103, 839-850.

Torres, E., and Rosen, M.K. (2003). Contingent phosphorylation/dephosphorylation provides a mechanism of molecular memory in WASP. *Mol Cell* 11, 1215-1227.

Tsuboi, T., and Fukuda, M. (2006). Rab3A and Rab27A cooperatively regulate the docking step of dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *J Cell Sci* 119, 2196-2203.

Tsuboi, T., Terakawa, S., Scalettar, B.A., Fantus, C., Roder, J., and Jeromin, A. (2002). Sweeping model of dynamin activity. Visualization of coupling between exocytosis and endocytosis under an evanescent wave microscope with green fluorescent proteins. *J Biol Chem* 277, 15957-15961.

Tsukita, S., and Yonemura, S. (1999). Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J Biol Chem* 274, 34507-34510.

U

Urbe, S., Dittie, A.S., and Tooze, S.A. (1997). pH-dependent processing of secretogranin II by the endopeptidase PC2 in isolated immature secretory granules. *Biochem J* 321 (Pt 1), 65-74.

Urbe, S., Page, L.J., and Tooze, S.A. (1998). Homotypic fusion of immature secretory granules during maturation in a cell-free assay. *J Cell Biol* 143, 1831-1844.

V

Varadi, A., Tsuboi, T., and Rutter, G.A. (2005). Myosin Va transports dense core secretory vesicles in pancreatic MIN6 beta-cells. *Mol Biol Cell* 16, 2670-2680.

Varoqueaux, F., Sons, M.S., Plomp, J.J., and Brose, N. (2005). Aberrant morphology and residual transmitter release at the Munc13-deficient mouse neuromuscular synapse. *Mol Cell Biol* 25, 5973-5984.

Vitale, M.L., Rodriguez Del Castillo, A., Tchakarov, L., and Trifaro, J.M. (1991). Cortical filamentous actin disassembly and scinderin redistribution during chromaffin cell stimulation precede exocytosis, a phenomenon not exhibited by gelsolin. *J Cell Biol* 113, 1057-1067.

Vitale, M.L., Seward, E.P., and Trifaro, J.M. (1995). Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis. *Neuron* 14, 353-363.

Vitale, N., Caumont, A.S., Chasserot-Golaz, S., Du, G., Wu, S., Sciorra, V.A., Morris, A.J., Frohman, M.A., and Bader, M.F. (2001). Phospholipase D1: a key factor for the exocytotic machinery in neuroendocrine cells. *Embo J* 20, 2424-2434.

Vitale, N., Chasserot-Golaz, S., and Bader, M.F. (2002). Regulated secretion in chromaffin cells: an essential role for ARF6-regulated phospholipase D in the late stages of exocytosis. *Ann N Y Acad Sci* 971, 193-200.

Voets, T., Toonen, R.F., Brian, E.C., de Wit, H., Moser, T., Rettig, J., Sudhof, T.C., Neher, E., and Verhage, M. (2001). Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking. *Neuron* 31, 581-591.

Volkman, N., Amann, K.J., Stoilova-McPhie, S., Egile, C., Winter, D.C., Hazelwood, L., Heuser, J.E., Li, R., Pollard, T.D., and Hanein, D. (2001). Structure of Arp2/3 complex in its activated state and in actin filament branch junctions. *Science* 293, 2456-2459.

von Gersdorff, H., and Matthews, G. (1994). Dynamics of synaptic vesicle fusion and membrane retrieval in synaptic terminals. *Nature* 367, 735-739.

W

Wang, C.T., Bai, J., Chang, P.Y., Chapman, E.R., and Jackson, M.B. (2006). Synaptotagmin-Ca²⁺ triggers two sequential steps in regulated exocytosis in rat PC12 cells: fusion pore opening and fusion pore dilation. *J Physiol* 570, 295-307.

Wang, C.T., Grishanin, R., Earles, C.A., Chang, P.Y., Martin, T.F., Chapman, E.R., and Jackson, M.B. (2001). Synaptotagmin modulation of fusion pore kinetics in regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Science* 294, 1111-1115.

Wang, C.T., Lu, J.C., Bai, J., Chang, P.Y., Martin, T.F., Chapman, E.R., and Jackson, M.B. (2003a). Different domains of synaptotagmin control the choice between kiss-and-run and full fusion. *Nature* 424, 943-947.

Wang, L., Merz, A.J., Collins, K.M., and Wickner, W. (2003b). Hierarchy of protein assembly at the vertex ring domain for yeast vacuole docking and fusion. *J Cell Biol* 160, 365-374.

Waseem, T.V., Kolos, V.A., Lapatsina, L.P., and Fedorovich, S.V. (2006). Influence of cholesterol depletion in plasma membrane of rat brain synaptosomes on calcium-dependent and calcium-independent exocytosis. *Neurosci Lett* 405, 106-110.

Waselle, L., Gerona, R.R., Vitale, N., Martin, T.F., Bader, M.F., and Regazzi, R. (2005). Role of phosphoinositide signaling in the control of insulin exocytosis. *Mol Endocrinol* 19, 3097-3106.

Watanabe, M., Nomura, K., Ohyama, A., Ishikawa, R., Komiya, Y., Hosaka, K., Yamauchi, E., Taniguchi, H., Sasakawa, N., Kumakura, K., Ushiki, T., Sato, O., Ikebe, M., and Igarashi, M. (2005). Myosin-Va regulates exocytosis through the submicromolar Ca²⁺-dependent binding of syntaxin-1A. *Mol Biol Cell* 16, 4519-4530.

Weaver, A.M., Karginov, A.V., Kinley, A.W., Weed, S.A., Li, Y., Parsons, J.T., and Cooper, J.A. (2001). Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Curr Biol* 11, 370-374.

Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Sollner, T.H., and Rothman, J.E. (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92, 759-772.

Weernink, P.A., Meletiadis, K., Hommeltenberg, S., Hinz, M., Ishihara, H., Schmidt, M., and Jakobs, K.H. (2004). Activation of type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms by the Rho GTPases, RhoA, Rac1, and Cdc42. *J Biol Chem* 279, 7840-7849.

Wegner, A., and Isenberg, G. (1983). 12-fold difference between the critical monomer concentrations of the two ends of actin filaments in physiological salt conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 4922-4925.

Welch, M.D. (1999). The world according to Arp: regulation of actin nucleation by the Arp2/3 complex. *Trends Cell Biol* 9, 423-427.

Welch, M.D., Iwamatsu, A., and Mitchison, T.J. (1997). Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature* 385, 265-269.

Wendler, F., Page, L., Urbe, S., and Tooze, S.A. (2001). Homotypic fusion of immature secretory granules during maturation requires syntaxin 6. *Mol Biol Cell* *12*, 1699-1709.

West, M.A., Prescott, A.R., Eskelinen, E.L., Ridley, A.J., and Watts, C. (2000). Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation. *Curr Biol* *10*, 839-848.

Winder, S.J., and Ayscough, K.R. (2005). Actin-binding proteins. *J Cell Sci* *118*, 651-654.

Winkler, H. (1997). Membrane composition of adrenergic large and small dense cored vesicles and of synaptic vesicles: consequences for their biogenesis. *Neurochem Res* *22*, 921-932.

Winter, D., Podtelejnikov, A.V., Mann, M., and Li, R. (1997). The complex containing actin-related proteins Arp2 and Arp3 is required for the motility and integrity of yeast actin patches. *Curr Biol* *7*, 519-529.

Wu, M.M., Grabe, M., Adams, S., Tsien, R.Y., Moore, H.P., and Machen, T.E. (2001). Mechanisms of pH regulation in the regulated secretory pathway. *J Biol Chem* *276*, 33027-33035.

Y

Yin, H.L., and Janmey, P.A. (2003). Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Physiol* *65*, 761-789.

Yoo, S.H. (1995). pH- and Ca²⁺-induced conformational change and aggregation of chromogranin B. Comparison with chromogranin A and implication in secretory vesicle biogenesis. *J Biol Chem* *270*, 12578-12583.

Z

Zerial, M., and McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* *2*, 107-117.

Zhang, X., Bi, E., Novick, P., Du, L., Kozminski, K.G., Lipschutz, J.H., and Guo, W. (2001). Cdc42 interacts with the exocyst and regulates polarized secretion. *J Biol Chem* *276*, 46745-46750.

Zheng, Y., Bagrodia, S., and Cerione, R.A. (1994). Activation of phosphoinositide 3-kinase activity by Cdc42Hs binding to p85. *J Biol Chem* *269*, 18727-18730.

Zigmond, S.H. (2004). Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr Opin Cell Biol* *16*, 99-105.

Zobiack, N., Rescher, U., Ludwig, C., Zeuschner, D., and Gerke, V. (2003). The annexin 2/S100A10 complex controls the distribution of transferrin receptor-containing recycling endosomes. *Mol Biol Cell* *14*, 4896-4908.