

# UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG I

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

## THESE

*Discipline : Sciences du vivant*

*Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie*

Présentée par

***Emeline Umbrecht-Jenck***

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

**Implication de l'annexine A2 lors de l'assemblage  
des sites d'exocytose dans les cellules chromaffines.**

Soutenue publiquement le 23 Novembre 2007 devant le jury composé de :

Rapporteur interne :

***Mr le Pr. Jan De Mey, Professeur de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg***

Rapporteurs externes :

***Mr le Dr. Frank Lafont, Directeur de Recherche CNRS***

***Mr le Dr. François Darchen, Directeur de recherche INSERM***

Directrice de thèse :

***Mme le Dr. Sylvette Chasserot-Golaz, Chargée de Recherche INSERM, HDR***



# Remerciements

Le travail présenté dans ce manuscrit a été effectué à l'Institut de Neurosciences Cellulaires et Intégratives, ULP/CNRS UMR 7168, dans le département « Neurotransmission et Sécrétion Neuroendocrine » dirigé par le Dr. Marie-France Bader.

Je tiens à remercier particulièrement le Pr. Jan De Mey, le Dr. Frank Lafont et le Dr. François Darchen, qui ont généreusement accepté de faire partie de mon jury et de consacrer une partie de leur temps à évaluer mon travail de thèse.

Merci à Marie-France Bader de m'avoir accueillie au sein de son équipe et d'avoir ainsi fait de ces trois années de thèse un moment riche et instructif.

Un grand merci également à Sylvette Chasserot-Golaz, ma directrice de thèse, sans qui ce manuscrit n'aurait peut-être jamais vu le jour. Elle a su m'encadrer sans être trop directive, ce qui m'a permis d'apprendre beaucoup de choses sur la Science et sur moi-même. Nos discussions ont toujours été enrichissantes en tous points, et je lui sais gré de la patience qu'elle a conservée jusqu'au bout, même si, il faut bien le dire, je lui ai sûrement donné bien du fil à retordre !

Je remercie aussi Valérie Calco, qui m'a initiée à la biologie moléculaire dans la joie et la bonne humeur et pour qui les relectures de manuscrit n'ont plus de secrets. Merci d'avoir toujours été là pour répondre à mes questions, me remonter le moral quand il était trop bas, ou tout simplement partager un moment agréable !

Mes remerciements également à Valérie Demais, pour sa grande compétence en microscopie électronique. Elle m'a appris à faire ces fameuses analyses statistiques de Ripley, et je ne compte plus les heures passées côte à côte avec elle à cliquer les billes une à une...

Merci à Nicolas Vitale, Stéphane Gasman, Jaroslava Ciesielski-Treska, Maria Zeniou-Meyer et Mara Ceridono, avec qui les discussions scientifiques ont été nombreuses et fructueuses, et qui ont su faire régner une ambiance de travail agréable au sein de l'équipe... Un remerciement tout spécial à Nancy Grant, pour sa gentillesse, ses conseils techniques avisés et son aide précieuse en anglais.

Merci aussi à Gaby Ulrich, pour son aide technique toujours appréciable et sans qui la gestion des stocks et les commandes de produits seraient une véritable catastrophe, et à Tam Tahouly, responsable de l'indispensable culture de cellules chromaffines.

Je n'oublie pas bien sûr tous mes compagnons de paillasse et de bureau, avec qui travailler est un vrai bonheur : Petra Tryoen-Toth et Magali Malacombe, dont la présence dans le

bureau a mis une animation agréable ; Elodie Fourcaudot et Renaud Thiébaud, avec qui la rédaction d'une thèse devient un moment de plaisir, surtout avec du thé et du chocolat ; Aurélie Béglé, Aurore Niemiec, Fanny Momboisse, et Matthias Corrotte, avec qui il est aussi facile de discuter de sciences que d'une foule d'autres choses intéressantes ; sans compter tous ceux qui, de près ou de loin, ont participé au bon déroulement de ces quatre années de thèse, que je n'ai pas cités, mais que je remercie de tout cœur.

Finalement, je souhaite remercier chaleureusement ma maman et Bernard d'avoir fait en sorte que je puisse poursuivre mes études dans les meilleures des conditions qui soient, et de m'avoir toujours soutenue dans mes choix. Merci aussi à mes frères et sœurs adorés : Florine, Diane, Renaud et Gauthier, pour leur affection et pour tous les moments partagés qui permettent de laisser de côté les soucis pendant un temps. Pour finir, un merci tout spécial à Anthony, pour son amour et son soutien de tous les instants.

Merci à tous...

# Abréviations

Par ordre alphabétique :

5HT :	5-HydroxyTryptamine
ABC :	ATP Binding Cassette
Actine-F :	Actine Filamenteuse
Actine-G :	Actine monomérique
ADP :	Adénosine DiPhosphate
AMP :	Adénosine MonoPhosphate
ATP :	Adénosine TriPhosphate
ARF :	ADP Ribosylation Factor
ARNO :	ARF Nucleotide binding site Opener
BCR :	B-Cell Receptor
BHK :	Baby Hamster Kidney
BoNT :	Botulinum NeuroToxin
BSA :	Bovine Serum Albumin
Ca <sup>2+</sup> :	ions calcium
C-ter :	extrémité Carboxy-terminale
DBH:	Dopamine-β-Hydroxylase
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DRM :	Detergent-Resistant Membrane
ECL :	Enhanced ChemiLuminescence
EGF :	Epidermal Growth Factor
FCS :	Fluorescence Correlation Spectroscopy
FRET :	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GAP :	GTPase Activating Protein
GDP :	Guanosine DiPhosphate
GEEC :	GPI-enriched Early Endosomal Compartment
GFP :	Green Fluorescent Protein
GIT1 :	G protein-coupled receptor kinase InTeractor
GPI :	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
GST :	Glutathion S-Transférase
GTP :	Guanosine TriPhosphate
GTPase :	Guanosine TriPhosphatase
IP3 :	Inositol triPhosphate
MAPK :	Mitogen-Activated Protein Kinase
MDCK :	Madin-Darby Canine Kidney
MET :	Microscopie Electronique à Transmission

MuSK :	Muscle Specific receptor tyrosine Kinase
NSF :	N-ethylmaleimide-Sensitive Factor
N-ter :	extrémité amino-terminale
N-WASP :	Neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
PA :	Acide Phosphatidique
PBS :	Phosphate Buffer Saline
PC :	Phosphatidyl-Choline
PE :	Phosphatidyl-Ethanolamine
PH :	Pleckstrin Homology
PI :	Phosphatidyl-Inositol
PI3K :	Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase
PI4K :	Phosphatidyl-Inositol 4-Kinase
PIP2 :	Phosphatidyl-Inositol (4,5) diPhosphate
PIP3 :	Phosphatidyl-Inositol (3,4,5) triPhosphate
PKC :	Protéine Kinase C
PLC :	Phospholipase C
PLD1 :	Phospholipase D1
PNMT :	Phényl-N-Méthyl-Transférase
PS :	Phosphatidyl-Sérine
RGS :	Regulator of G-protein Signaling
RRP :	Readily-Releasable-Pool
SNAP-25 :	SyNaptosomal Associated Protein of 25 kD
SNAP :	Soluble NSF Attachment Protein
SNARE :	SNAP REceptor
SPT :	Single Particle Tracking
SRP :	Slowly-Releasable-Pool
STED :	STimulation Emission Depletion microscopy
T3SS :	Type III Secretion System
TASK1 :	Two-pore Acid-Sensitive K <sup>+</sup> channel 1
TBS :	Tris Buffer Saline
TCA :	TriChloroAcétique acid
TCR :	T-cell receptor
TeNT :	NeuroToxine Tetanique
TGN :	Trans-Golgi Network
TIRFM :	Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy
tPA :	tissue Plasminogen Activator
TRPV5 :	Transient Receptor Potential V5
t-SNARE :	target-SNARE
v-SNARE :	vesicular-SNARE
VAMP :	Vesicular-Associated Membrane Protein
VIH :	Virus de l'Immunodéficience Humaine
WT :	phénotype sauvage (Wild-Type)

# Table des matières

AVANT-PROPOS.....	11
-------------------	----

<b><u>PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION GENERALE.....</u></b>	<b>13</b>
--	-----------

<b>A. L'EXOCYTOSE DANS LES CELLULES SECRETRICES.....</b>	<b>13</b>
--	-----------

1) Introduction.....	13
2) Un modèle de cellule sécrétrice : la cellule chromaffine .....	15
3) La biogenèse et la maturation des granules de sécrétion.....	17
4) Les étapes de l'exocytose régulée.....	19
a) <i>Le déclenchement de l'exocytose</i> .....	20
b) <i>Le recrutement des granules de sécrétion</i> .....	21
c) <i>L'arrimage et l'amorçage</i> .....	23
d) <i>La fusion</i> .....	25
e) <i>Conclusion</i> .....	27
5) Zoom sur les protéines du complexe SNARE.....	29
6) Le cytosquelette et l'exocytose .....	33
7) Conclusion .....	34

<b>B. LES ANNEXINES ET L'EXOCYTOSE.....</b>	<b>37</b>
---	-----------

<b>I) Les annexines, une famille de protéines très conservées dans l'évolution. ....</b>	<b>37</b>
--	-----------

1) La classification et la nomenclature des annexines.....	37
2) La structure des annexines .....	39
a) <i>Le domaine C-terminal possède les caractéristiques structurales communes à toutes les annexines</i> .....	39
b) <i>Le domaine N-terminal est spécifique de chaque annexine</i> .....	41
3) La localisation des annexines.....	42
4) Les différentes fonctions des annexines.....	43
a) <i>Les annexines dans le trafic membranaire intracellulaire</i> .....	43
b) <i>La formation et la régulation de canaux ioniques par les annexines</i> .....	45
c) <i>Les fonctions extracellulaires des annexines</i> .....	45

<b>II) L'annexine A2 et l'exocytose.....</b>	<b>47</b>
--	-----------

1) Les particularités de l'annexine A2.....	47
a) <i>La protéine S100A10 et la formation du tétramère</i> .....	47
b) <i>Les phosphorylations de l'annexine A2 par la PKC et pp60<sup>src</sup></i> .....	51
c) <i>La liaison au phosphatidyl-inositol (4, 5) bisphosphate (PIP2)</i> .....	51
d) <i>La liaison à l'actine</i> .....	53
2) L'annexine A2 dans le trafic membranaire.....	55
a) <i>Annexine A2 et exocytose</i> .....	55
b) <i>Annexine A2 et endocytose</i> .....	56
3) Conclusion .....	57

<b>C. MEMBRANES BIOLOGIQUES ET MICRODOMAINES LIPIDIQUES.....</b>	<b>59</b>
<b>I) Un peu d’histoire sur les membranes biologiques.....</b>	<b>59</b>
<b>II) Les microdomaines lipidiques : définition et terminologie.....</b>	<b>61</b>
1) Les caractéristiques des microdomaines lipidiques.....	61
a) <i>Les marqueurs lipidiques</i> .....	61
b) <i>Les marqueurs protéiques</i> .....	63
c) <i>La structure des microdomaines lipidiques et leurs propriétés physiques</i> .....	64
d) <i>Les caveolae, un sous-type de microdomaine lipidique</i> .....	65
2) Les méthodes d’étude des microdomaines membranaires .....	67
a) <i>La résistance à la solubilisation par les détergents</i> .....	67
b) <i>La séquestration ou la déplétion du cholestérol</i> .....	68
c) <i>Les techniques de visualisation in situ</i> .....	68
d) <i>Conclusion</i> .....	71
<b>III) Les modes d’action des microdomaines lipidiques.....</b>	<b>73</b>
1) Les rôles liés aux propriétés physiques des microdomaines lipidiques.....	73
2) La régulation de la conformation et de l’activité de protéines .....	75
3) La régulation de la formation de complexes moléculaires de signalisation .....	76
a) <i>La formation de agrégats de récepteurs</i> .....	76
b) <i>La formation de complexes multimoléculaires</i> .....	77
c) <i>La ségrégation de voies de signalisation impliquant des effecteurs communs</i> .....	78
4) Les microdomaines lipidiques : porte d’entrée pour certains pathogènes.....	79
<b>IV) La formation et la régulation des microdomaines lipidiques.....</b>	<b>81</b>

## **DEUXIEME PARTIE : RESULTATS.....** **83**

<b>A. LES SITES D’EXOCYTOSE : DES MICRODOMAINES LIPIDIQUES FORMES PAR L’ANNEXINE A2 ? .....</b>	<b>83</b>
<b>I) Introduction .....</b>	<b>83</b>
<b>II) Publication 1 .....</b>	<b>84</b>
<b>III) Résultats et discussion.....</b>	<b>85</b>
<b>B. COMMENT L’ANNEXINE A2 EST-ELLE RECRUTEE PRES DE LA MACHINERIE D’EXOCYTOSE ?.....</b>	<b>89</b>
<b>I) Introduction .....</b>	<b>89</b>
<b>II) Publication 2 .....</b>	<b>90</b>
<b>III) Discussion.....</b>	<b>91</b>

**C. PAR QUEL MECANISME L'ANNEXINE A2 FORME-T-ELLE  
LES MICRODOMAINES LIPIDIQUES ?..... 95**

**I) Introduction ..... 95**

**II) Résultats ..... 97**

1) Il existe des structures d'actine au niveau des granules arrimés ..... 97

2) L'actine est associée aux microdomaines lipidiques enrichis en GM1 dans les cellules stimulées ... 97

3) L'actine est nécessaire à la formation des microdomaines lipidiques..... 103

4) La fasciculation de l'actine par l'annexine A2 participerait à la formation des radeaux lipidiques au niveau des sites d'exocytose. .... 105

**III) Conclusion..... 109**

**TROISIEME PARTIE : DISCUSSION GENERALE.....116**

**I) L'annexine A2 est recrutée au niveau de présites d'exocytose. .... 116**

**II) L'actine participe à la formation des microdomaines lipidiques par l'annexine A2. .... 118**

1) L'annexine A2 réorganise le cytosquelette d'actine au niveau des sites d'exocytose..... 118

2) La formation de microdomaines par l'annexine A2 requiert-elle l'intervention séquentielle ou synergique de l'actine et des lipides ? ..... 120

3) Quel rôle pour les autres éléments du cytosquelette ?..... 121

**III) Le rôle des microdomaines lipidiques formés par l'annexine A2 dans l'exocytose. .... 122**

1) Les microdomaines lipidiques participeraient à l'assemblage de la machinerie sécrétrice..... 122

2) Les microdomaines lipidiques seraient capables d'activer la machinerie de sécrétion..... 124

3) L'intervention des microdomaines lipidiques dans la fusion. .... 125

**IV) Perspectives..... 127**

**MATERIEL ET METHODES.....129**

**I) Culture cellulaire, transfections et mesures de sécrétion ..... 129**

1) Mise en culture primaire des cellules chromaffines bovines et transfections ..... 129

2) Mesure de la sécrétion de noradrénaline tritiée par les cellules chromaffines. .... 130

<b>II)</b>	<b>Techniques de biologie moléculaire .....</b>	<b>131</b>
1)	Génération de mutants de l'annexine A2 ne liant plus l'actine.....	131
2)	Génération de mutants d'annexine A2 ne liant plus le PIP2 .....	132
<b>III)</b>	<b>Techniques biochimiques.....</b>	<b>133</b>
1)	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, électrotransfert sur membrane de nitrocellulose et immunodétection.....	133
2)	Révélation du GM1 sur nitrocellulose. ....	134
3)	Séparation des micro-domaines lipidiques.....	135
a)	<i>Sur gradient d'Optiprep<sup>TM</sup></i> .....	135
b)	<i>Sur gradient de saccharose</i> .....	136
4)	Purification de granules de sécrétion .....	137
a)	<i>Sur coussin de saccharose</i> .....	137
b)	<i>Sur gradient continu de saccharose</i> .....	138
5)	Co-précipitation <i>in vitro</i> de la protéine S100A10 avec la VAMP2 fusionnée à la GST .....	138
a)	<i>Production et purification de la protéine S100A10</i> .....	138
b)	<i>Production de la GST-VAMP2<sub>1-96</sub> et co-précipitation</i> .....	139
<b>IV)</b>	<b>Techniques de microscopie.....</b>	<b>140</b>
1)	Cytochimie et microscopie confocale .....	140
a)	<i>Marquages cytochimiques</i> .....	140
b)	<i>Microscopie confocale</i> .....	142
2)	Feuillets de membrane plasmique, microscopie électronique à transmission et analyses statistiques.....	142
a)	<i>Préparation des feuillets de membrane plasmique et observation en microscopie électronique</i> .....	143
b)	<i>Analyse statistique de la distribution des marquages par la fonction K de Ripley</i> .....	143
	<b><u>BIBLIOGRAPHIE</u>.....</b>	<b>147</b>

# Avant-Propos

L'équipe du Dr Marie-France Bader s'intéresse depuis plusieurs années aux mécanismes moléculaires régissant l'exocytose régulée dans les cellules chromaffines. Un grand nombre d'acteurs, tant protéiques que lipidiques, ont été impliqués dans ce processus, mais une question majeure reste sans réponse : quel mécanisme participe à la régulation spatiotemporelle nécessaire au bon fonctionnement de la machinerie de l'exocytose dans son ensemble ? Parmi les protéines intervenant dans la sécrétion régulée, l'annexine A2 était un bon candidat pour participer à ce contrôle biologique, en vertu de ses interactions avec de nombreux partenaires, en particulier les lipides et le cytosquelette d'actine qui sont fortement impliqués dans le processus sécréteur.

Le but de mon projet de thèse a donc été de déterminer le rôle de l'annexine A2 au cours de l'exocytose régulée dans les cellules chromaffines, en recherchant particulièrement son implication dans l'organisation des membranes et du cytosquelette d'actine.

Ce manuscrit s'articule en trois parties. Premièrement, une introduction générale me permettra de poser les bases bibliographiques qui ont servi à l'élaboration de mon projet de thèse.

Un premier chapitre traitera du processus d'exocytose régulée par le calcium dans les cellules neuroendocrines. Je commencerai par décrire le modèle cellulaire expérimental que nous avons utilisé au laboratoire, à savoir la cellule chromaffine. Puis je passerai en revue les différentes étapes de la sécrétion régulée, depuis la biogénèse des granules jusqu'à leur fusion avec la membrane plasmique. Je terminerai en me focalisant sur l'importance des protéines du complexe SNARE et du cytosquelette cellulaire au cours du processus sécréteur.

Le second chapitre me permettra de présenter une famille de protéines très conservée dans l'évolution, la famille des annexines, qui a une grande importance physiologique surtout dans des événements liés aux membranes cellulaires. J'évoquerai les caractéristiques structurales et fonctionnelles des annexines, puis je me focaliserai sur les particularités de l'annexine A2 et sur le rôle de cette protéine dans le trafic membranaire et plus précisément dans l'exocytose.

Le dernier chapitre de l'introduction générale sera consacré à l'organisation des membranes biologiques. Je commencerai par décrire l'évolution du concept de membrane biologique depuis le modèle de Singer et Nicolson jusqu'au modèle actuel, en m'attachant particulièrement aux microdomaines lipidiques organisant les phénomènes membranaires. Je

décrirai ensuite les caractéristiques de ces microdomaines lipidiques et je donnerai également les différentes méthodes permettant de les étudier. La diversité des fonctions auxquelles les microdomaines lipidiques ont été associés ne me permettant pas d'en faire une revue exhaustive, j'aurai à cœur de présenter leurs modes d'action possibles, en me basant sur quelques exemples. Pour terminer, j'expliquerai par quel moyen les microdomaines lipidiques peuvent être formés et quels sont les mécanismes permettant leur régulation.

La seconde partie de ce manuscrit présentera les résultats obtenus au cours de ma thèse. Un chapitre sera consacré à ma première publication, dans laquelle nous avons pu mettre en évidence un rôle de l'annexine A2 dans la formation de microdomaines lipidiques pour constituer des sites d'exocytose fonctionnels. L'étude concernant le rôle de la protéine S100A10 dans le recrutement de l'annexine A2 au niveau de présites d'exocytose présents dans la membrane plasmique fera l'objet du second chapitre. Finalement, je développerai les résultats obtenus pour comprendre les mécanismes de formation des microdomaines lipidiques par l'annexine A2 au cours de l'exocytose, et je montrerai l'implication du cytosquelette d'actine dans ce processus.

Finalement, dans la troisième partie de ce manuscrit, je discuterai de façon plus générale l'ensemble de mes résultats. J'aborderai tout d'abord la notion de présite d'exocytose, puis l'implication du cytosquelette d'actine dans l'organisation de la membrane plasmique lors du processus de sécrétion, et enfin j'exposerai les différents rôles que les microdomaines lipidiques pourraient jouer au cours de l'exocytose.

Les données présentées dans ce manuscrit devraient apporter une vue plus précise des mécanismes permettant la régulation spatiotemporelle de l'exocytose régulée dans les cellules chromaffines, en mettant en avant le rôle essentiel de l'annexine A2.

# A. L'exocytose dans les cellules sécrétrices

## 1) Introduction

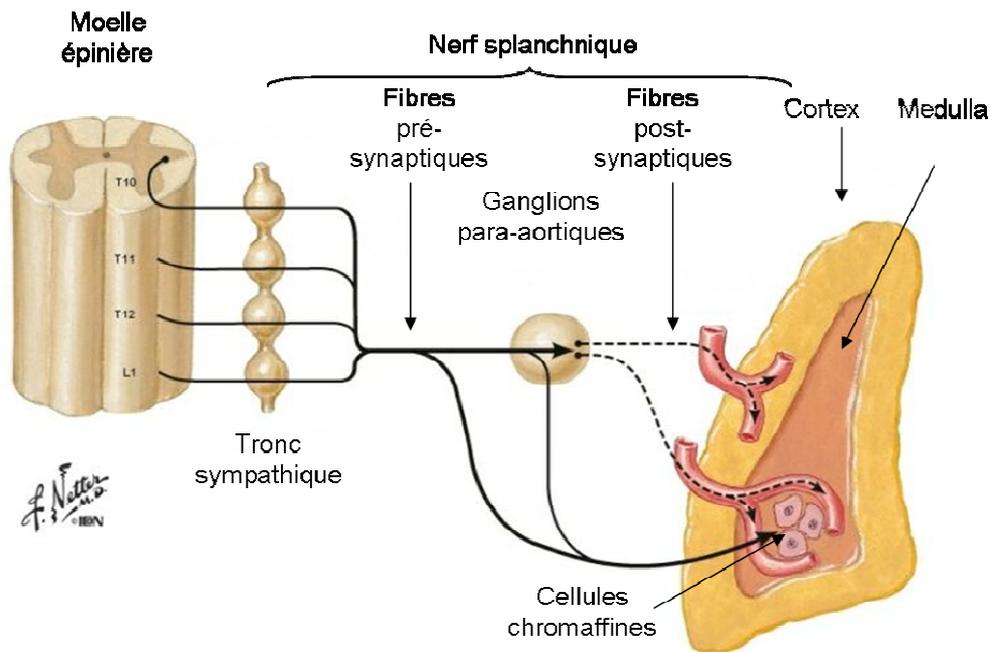
L'exocytose est un phénomène biologique fondamental qui permet à une cellule d'effectuer de nombreuses tâches comme la croissance et le renouvellement des constituants de sa membrane plasmique. Ce mécanisme est également à la base de la communication entre les cellules, par le biais de la sécrétion de neurotransmetteurs ou d'hormones. Un tel phénomène a donc une grande importance physiologique, puisqu'il va permettre à la fois de maintenir l'intégrité de la cellule et celle de l'organisme dans son ensemble (Bader et al., 2004; Burgoyne and Morgan, 2003).

Il existe deux types d'exocytose : une exocytose constitutive et une exocytose régulée. Quel que soit le type d'exocytose, celle-ci fait intervenir des éléments cellulaires appelés vésicules ou granules, présents dans le cytosol, qui vont fusionner avec la membrane plasmique et libérer leur contenu dans le milieu extracellulaire. L'exocytose est généralement couplée à l'endocytose, qui est le phénomène inverse, permettant le bourgeonnement de la membrane plasmique pour former des vésicules intracellulaires (Burgoyne and Morgan, 2003; Malacombe et al., 2006; Montecucco et al., 2005).

L'exocytose constitutive se produit en permanence et permet le renouvellement des protéines et des lipides constituant la membrane (Stojilkovic, 2005). Elle est ainsi responsable du maintien des conditions nécessaires au bon fonctionnement de la cellule.

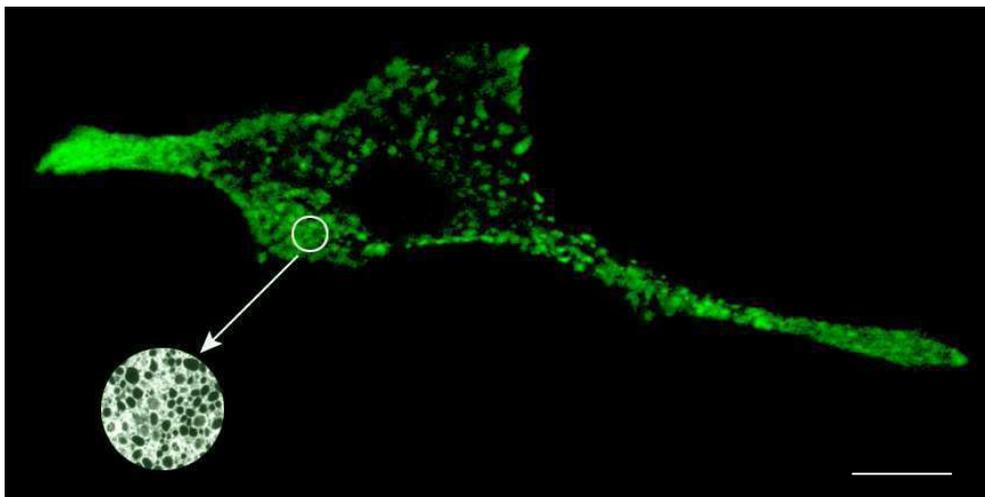
L'exocytose régulée, en revanche, nécessite la réception par la cellule d'un signal déclencheur, généralement une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium. L'exocytose régulée a des rôles variés, comme par exemple l'incorporation de membrane pour permettre la migration cellulaire, la phagocytose, et l'apport de récepteurs ou de canaux spécifiques pour potentialiser un effet (Chierigatti and Meldolesi, 2005).

Dans les cellules endocrines, exocrines et dans les neurones, l'exocytose a pour but la libération des hormones ou neurotransmetteurs contenus respectivement dans des granules de sécrétion ou des vésicules synaptiques.



**Figure 1 : L'innervation de la glande surrénale.**

Les cellules chromaffines sont situées dans la partie médullaire de la glande surrénale et sont sous le contrôle d'une innervation par le nerf splanchnique. Les fibres nerveuses libèrent de l'acétylcholine, stimulant les récepteurs nicotiques des cellules chromaffines, qui vont alors libérer le contenu de leurs granules dans la circulation sanguine. Source : <http://www.netterimages.com/>



**Figure 2 : La visualisation des granules de sécrétion dans une cellule chromaffine.**

L'image principale a été acquise au microscope confocal et présente une cellule chromaffine dont les granules de sécrétion ont été visualisés grâce à un anticorps dirigé contre la chromogranine A puis à un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488. L'encart montre les granules chromaffines visualisés en microscopie électronique à transmission. Barre : 5  $\mu\text{m}$ .

L'exocytose est classiquement divisée en 4 étapes-clefs successives (Burgoyne and Morgan, 2003; Stojilkovic, 2005) : le recrutement des vésicules ou granules à la membrane plasmique, leur arrimage à la membrane plasmique, une étape de maturation ou amorçage des vésicules ou granules et enfin, la fusion de la membrane vésiculaire ou granulaire avec la membrane plasmique qui permet la libération de leur contenu dans le milieu extracellulaire. Chacune de ces étapes fait intervenir une machinerie très complexe, regroupant des dizaines de protéines et de lipides différents dont les rôles précis n'ont pas tous été élucidés.

Dans ce chapitre, je présenterai tout d'abord les cellules chromaffines, modèle cellulaire utilisé pour nos études, puis je décrirai les différentes étapes de l'exocytose régulée, en commençant par la biogénèse des granules pour terminer par la fusion du granule avec la membrane plasmique. J'évoquerai également les principaux acteurs moléculaires impliqués dans ce processus.

## **2) Un modèle de cellule sécrétrice : la cellule chromaffine**

Les cellules chromaffines sont des cellules sécrétrices situées dans la partie médullaire de la glande surrénale. Elles sont organisées en amas cellulaires séparés de tissu conjonctif et sont sous le contrôle du système nerveux sympathique par le biais d'une innervation cholinergique (figure 1). Ces cellules jouent un rôle très important dans la réponse physiologique au stress : l'activation du système sympathique va provoquer la stimulation des cellules chromaffines et permettre la libération d'hormones catécholaminergiques (dopamine, adrénaline, noradrénaline) qui régulent divers processus d'urgence, tels l'augmentation du rythme cardiaque, du rythme respiratoire, du taux de glucose sanguin ou encore la dilatation de la pupille. Ces phénomènes vont permettre à l'organisme de se préparer aux réactions de lutte ou de fuite face à une situation de danger potentiel (Aunis and Langley, 1999; Perlman and Chalfie, 1977).

Le cytoplasme des cellules chromaffines renferme des granules de sécrétion (figure 2). Ces granules apparaissent opaques en microscopie électronique, en raison de leur forte concentration protéique et peptidique, c'est pourquoi ils sont encore appelés granules à cœur dense. Ils contiennent les molécules destinées à être libérées, notamment les catécholamines, un certain nombre de peptides dont le peptide vasointestinal, le neuropeptide Y ou la substance P, et des protéines comme les chromogranines (tableau 1) (Apps, 1997).

**Tableau 1 : Principaux constituants des granules chromaffines (Winkler, 1997).**

<b>Composition de la matrice du granule</b>	
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 22 mM)
Enzymes/Protéines	enképhalinase, acétylcholinestérase, chromogranines A et B, sécrétogranine II
<b>Composition de la membrane du granule</b>	
Lipides	Cholestérol, phospholipides, gangliosides, lysophosphatidylcholine
Enzymes/Protéines	Transporteurs de catécholamines, nucléotides, échangeur Na/Ca, Cytochrome b561, Dopamine- $\beta$ -hydroxylase (DBH), H <sup>+</sup> ATPase I et II, NADH oxydoréductase, phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K), glycoprotéines II et III, fodrine, $\alpha$ -actinine, protéines G <sub>0</sub> , Rab3, RhoA, synaptotagmine, synaptobrévine

Dans la voie de synthèse des catécholamines, la dopamine est un précurseur de la noradrénaline, et cette dernière peut être à son tour métabolisée en adrénaline. Toutes les cellules chromaffines ne possèdent pas l'ensemble des enzymes de cette voie de synthèse. Ainsi, on distingue les cellules dopaminergiques (moins de 1%), les cellules noradrénergiques (15% environ), capables de sécréter dopamine et noradrénaline, et les cellules adrénérgiques (les plus nombreuses, environ 85%), qui possèdent en plus l'enzyme permettant la conversion de la noradrénaline en adrénaline, la phényl-N-méthyl-transférase (PNMT), et peuvent donc libérer les trois catécholamines (Aunis and Langley, 1999; Trifaro, 2002).

Les cellules chromaffines sont un modèle très intéressant pour l'étude de l'exocytose. En effet, elles ont la même origine embryonnaire que les neurones, avec lesquels elles partagent un grand nombre d'éléments de la machinerie sécrétrice. Il est donc possible d'établir des liens entre ce qui se passe dans les cellules chromaffines et dans les neurones.

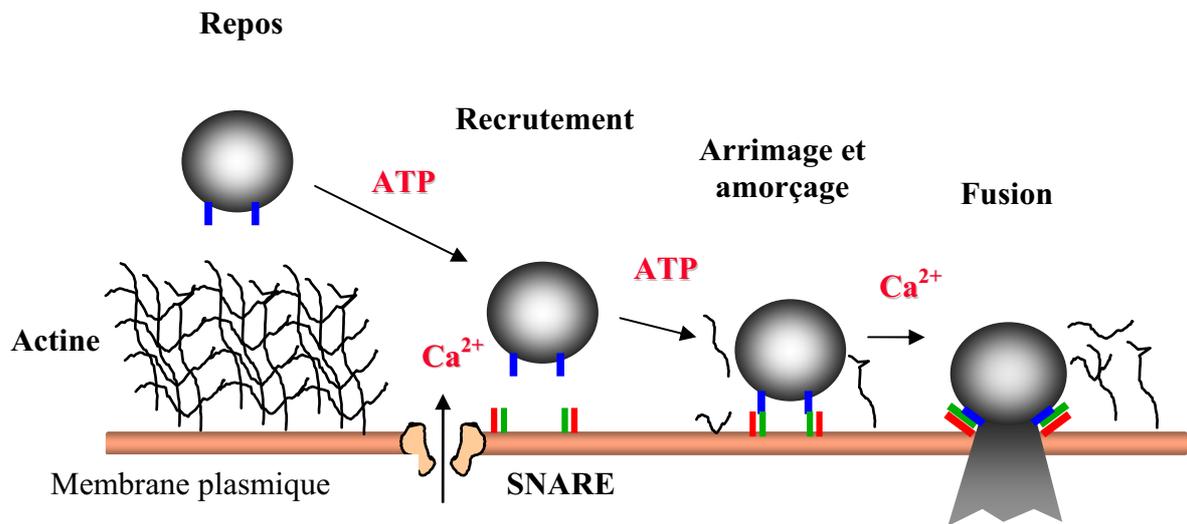
L'étude des cellules chromaffines présente des avantages techniques non négligeables. Tout d'abord, l'isolation des cellules chromaffines bovines est assez aisée. De plus, il est possible de récolter une grande quantité de cellules (environ  $30 \cdot 10^6$  cellules par glande surrénale de boeuf), ce qui est également profitable, car les études biochimiques nécessitent souvent de grandes quantités de matériel à analyser.

Un autre avantage est la taille relativement importante de ces cellules (15 à 20  $\mu\text{m}$ ), ce qui facilite les études nécessitant la manipulation d'une cellule unique, comme la microinjection ou certaines techniques électrophysiologiques. Jusqu'à présent, la transfection des cellules chromaffines était assez peu efficace. Pour cette raison, un grand nombre d'études portant sur l'exocytose des cellules neuroendocrines ont été effectuées sur une lignée cellulaire dérivée de cellules chromaffines noradrénergiques de phéochromocytome de rat, la lignée PC12 (Greene and Tischler, 1976), qui présente l'avantage d'être plus facilement transfectable. Toutefois, les progrès techniques récents permettent désormais d'obtenir, dans les cellules chromaffines, des taux de transfection de l'ordre de 30%, ce qui est suffisant pour étudier le comportement de mutants exprimés de façon transitoire (Bader et al., 2002).

Un troisième avantage est la taille des granules de sécrétion (de 150 à 300 nm) qui rend plus aisée l'observation des événements d'exocytose. Les catécholamines étant des molécules oxydables, l'utilisation de techniques comme l'ampérométrie, qui mesure l'oxydation des molécules au contact d'une fibre de carbone, permet d'accéder facilement à la quantité d'hormone libérée par une cellule isolée, voire par un seul granule sous l'effet d'une stimulation (Bader et al., 2002).

### **3) La biogenèse et la maturation des granules de sécrétion**

Les granules de sécrétion sont formés à partir du réseau trans-Golgien (TGN). La génération des granules dans ce réseau pourrait être causée par l'agrégation de protéines destinées à la sécrétion, comme les chromogranines A et B (Kim et al., 2006), car l'inhibition de l'expression des chromogranines dans des cellules PC12 diminue fortement le nombre de granules de sécrétion, alors que leur surexpression induit la formation de granules à cœur dense dans des cellules non sécrétrices (Burgoyne and Morgan, 2003; Huh et al., 2003; Kim et al., 2001). Un premier tri sélectif des lipides et protéines membranaires aussi bien qu'intragranulaires est réalisé dès la formation du granule dans le TGN. Ensuite, le granule va subir un processus complexe de maturation, au cours duquel il y aura enrichissement en protéines et lipides destinés à l'exocytose et élimination des éléments mal adressés. Ceci se



**Figure 3 : Les différentes étapes de l'exocytose régulée dans les cellules neuroendocrines.**

Les granules chromaffines passent par différentes étapes lors de la sécrétion : une première étape de recrutement permet au granule de parvenir à la membrane plasmique ; s'ensuit une phase d'arrimage et d'amorçage qui correspond à l'assemblage de la machinerie d'exocytose ; enfin la fusion du granule avec la membrane plasmique permet la libération du contenu granulaire dans le milieu extracellulaire.

fait par fusion de granules entre eux et par bourgeonnement et détachement de vésicules à clathrine (Burgoyne and Morgan, 2003; Kim et al., 2006). Parallèlement, il y a une acidification du contenu des granules grâce à une pompe à protons, la v-ATPase. L'entrée d'ions  $H^+$  induit un changement de pH, qui produit la force motrice nécessaire à la capture des catécholamines par leur transporteur, assure le maintien de ces hormones sous forme réduite, et finalement permet la maturation de protéines intragranulaires (Johnson, 1987; Kim et al., 2006).

Le granule mature peut alors être acheminé en périphérie grâce à l'intervention de protéines motrices et des microtubules (Neco et al., 2003). Cet aspect sera détaillé dans le paragraphe 6, sur l'importance du cytosquelette dans l'exocytose. Une fois parvenus en périphérie cellulaire, les granules attendent leur recrutement dans le processus d'exocytose régulée par le calcium.

#### **4) Les étapes de l'exocytose régulée**

Des études par TIRFM (total internal reflection fluorescence microscopy), réalisées sur des cellules vivantes, ont permis de visualiser le déplacement de granules contenant des molécules fluorescentes, dans l'espace subplasmalemmal situé à moins de 200 nm de la membrane plasmique (Steyer and Almers, 1999; Steyer et al., 1997). Dans les cellules chromaffines, les granules sont répartis en plusieurs populations. Les granules séparés de la membrane plasmique (granules de réserve) constituent environ 96% des 25000 à 30000 granules d'une cellule chromaffine bovine (Vitale et al., 1995). Les 4% restants sont déjà présents à la membrane plasmique (Parsons et al., 1995; Steyer et al., 1997) et peuvent être subdivisés en trois groupes : les granules arrimés et déjà prêts à fusionner (RRP : Readily-Releasable Pool et SRP : Slowly-Releasable Pool), les granules arrimés qui nécessitent encore une étape de maturation dépendant de l'ATP (Unprimed Pool), et les granules non arrimés mais proches de la membrane plasmique (Becherer and Rettig, 2006; Parsons et al., 1995).

En raison de la coexistence des différents sous-ensembles de granules au sein d'une même cellule, il est difficile de définir précisément les différentes étapes de l'exocytose du point de vue cinétique. Toutefois, les granules, même de façon asynchrone, passent tous par quatre étapes : le recrutement à la membrane plasmique, l'arrimage, l'amorçage, et enfin la fusion avec la membrane plasmique (figure 3).

### a) *Le déclenchement de l'exocytose*

Dans toutes les cellules sécrétrices, le déclenchement de l'exocytose fait suite à une stimulation des cellules par un sécrétagogue. Dans le cas de la cellule chromaffine *in vivo*, le sécrétagogue est l'acétylcholine libérée par les fibres nerveuses du système nerveux sympathique (Aunis and Langley, 1999). Les récepteurs de l'acétylcholine présents sur les cellules chromaffines de bœuf sont essentiellement de type nicotinique. Ce sont des récepteurs ionotropiques constitués de 5 sous-unités ( $\alpha_2\beta\delta\gamma$ ) formant un canal perméable aux ions cationiques (Karlín, 2002). La fixation de l'acétylcholine, ou de la nicotine, généralement utilisée en laboratoire pour mimer l'effet de l'acétylcholine, provoque l'ouverture du canal du récepteur, entraînant ainsi une dépolarisation de la membrane plasmique et l'ouverture de canaux calciques dépendants du voltage. Dans les cellules chromaffines bovines, ces canaux sont en majorité de type P/Q (environ 50%), mais il en existe également de type N (30%) et L (20%) (Cuchillo-Ibanez et al., 2002). L'entrée rapide et massive d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule est amplifiée par la libération de calcium depuis les stocks intracellulaires, et c'est l'élévation du taux de calcium intracellulaire qui est considérée comme le signal déclenchant de l'exocytose (Aunis and Langley, 1999). Une question importante reste pour l'instant sans réponse claire : la grande majorité des protéines impliquées dans l'exocytose étant insensibles au calcium, quels sont les partenaires responsables du couplage entre l'entrée des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et l'exocytose ? Plusieurs pistes ont déjà été explorées. Parmi les protéines comportant des domaines de liaison au calcium tels que le domaine C2, le domaine EF-hand, ou des sites moins typiques comme les domaines des annexines ou de la gelsoline (Barclay et al., 2005; Burgoyne and Morgan, 1998b), toutes ne sont pas forcément des interrupteurs calciques du processus sécréteur, c'est-à-dire des protéines capables de déclencher l'exocytose suite au signal calcique.

La protéine la plus présentée comme interrupteur calcique est la synaptotagmine, qui contient 2 domaines C2 et est présente sur la membrane des granules de sécrétion. Cette protéine subit un changement de conformation en présence de calcium et interagit avec plusieurs acteurs de l'exocytose, dont les protéines du complexe SNARE et des lipides tels que le PIP2 ou le PS (Barclay et al., 2005; Burgoyne and Morgan, 1998b; Chapman, 2002). La liaison du calcium sur la synaptotagmine provoquerait l'assemblage du complexe SNARE en conformation *trans* serrée, ainsi que la pénétration des domaines C2 dans la membrane plasmique. L'ensemble permettrait le rapprochement des membranes granulaire et plasmique pour permettre la fusion {Chapman, 2002 #401}. Bien que la synaptotagmine semble avoir un rôle important, elle n'est probablement pas la seule protéine permettant le couplage entre

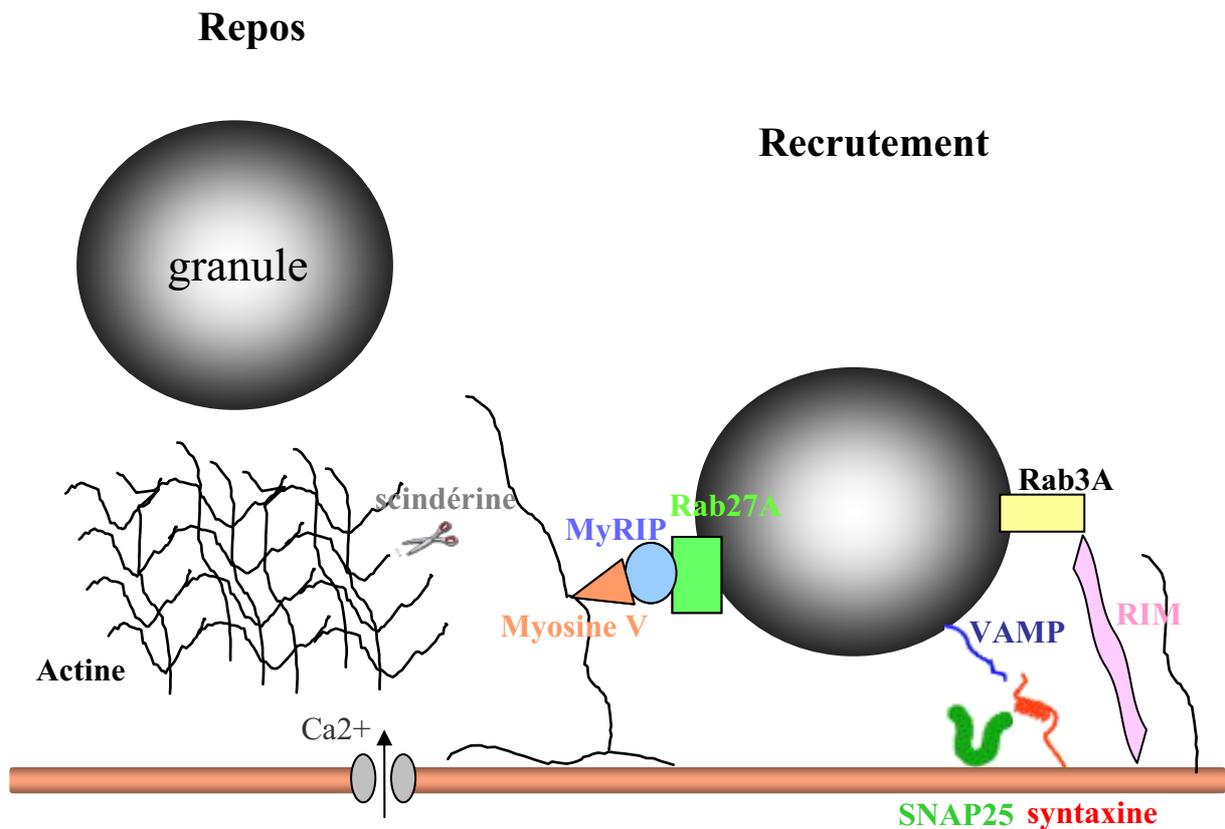
l'entrée de calcium et le mécanisme d'exocytose (Burgoyne and Morgan, 1998b). Il a par exemple été montré que la calmoduline pourrait, en présence de calcium, déplacer l'interaction de VAMP2 avec les lipides pour favoriser la formation des complexes SNARE et ainsi la fusion subséquente, de ce fait elle pourrait aussi participer au déclenchement de l'exocytose (De Haro et al., 2003; Quetglas et al., 2000). Les annexines, en particulier l'annexine A2, pourraient aussi jouer un rôle d'interrupteur calcique dans ce processus (Chasserot-Golaz et al., 1996; Monastyrskaya et al., 2006). D'autres protéines, comme par exemple la scindérine, clivant l'actine en présence de calcium, ne peuvent pas prétendre pour l'instant au titre d'interrupteur calcique, idem pour la PKC ou munc-13,..., dont les rôles précis restent encore à élucider (Barclay et al., 2005).

Il n'est pas exclu que toutes ces protéines soient impliquées dans la réception du signal calcique et dans l'activation de la cascade moléculaire à différents niveaux (Barclay et al., 2005; Burgoyne and Morgan, 1998b). Il n'existerait donc pas un senseur calcique unique mais plutôt un ensemble de senseurs agissant de concert ou séquentiellement à différentes étapes, ce qui permettrait une régulation très étroite et très fine du processus d'exocytose.

#### *b) Le recrutement des granules de sécrétion*

Dans les cellules chromaffines au repos, contrairement à ce qui se passe dans les neurones, la majeure partie des granules de sécrétion sont maintenus à distance de la membrane plasmique par un réseau de filaments d'actine (Vitale et al., 1995). Cette séparation physique pourrait être à la base de la différence de cinétique d'activation de l'exocytose entre les cellules chromaffines et les neurones : le signal calcique met plus de temps à atteindre les granules chromaffines que les vésicules synaptiques qui sont déjà arrimées à la membrane dans les neurones au repos (Burgoyne and Morgan, 1998b) ; et la dépolymérisation du cytosquelette d'actine sous-plasmalemmal pourrait favoriser la migration des granules vers la membrane plasmique (Bader et al., 2004; Gasman et al., 2003; Malacombe et al., 2006; Vitale et al., 1995). Ainsi, bien qu'une population de granules déjà présente à la membrane plasmique des cellules chromaffines soit aussi en mesure de sécréter rapidement leur contenu dans le milieu extracellulaire, le maximum de sécrétion est atteint à l'échelle de la centaine de microsecondes dans les neurones, et à l'échelle des quelques dizaines de millisecondes dans les cellules endocrines comme la cellule chromaffine (Burgoyne and Morgan, 2003; Morgan and Burgoyne, 1997).

La dépolymérisation de la barrière d'actine fait intervenir des protéines capables de modifier le cytosquelette d'actine suite à une augmentation du calcium intracellulaire, telle la



**Figure 4 : Le modèle présentant la diversité des acteurs du recrutement granulaire.** Lors de la stimulation de l'exocytose, l'entrée de calcium provoquerait la dépolymérisation de la barrière d'actine grâce à la scindérine. Le granule serait ensuite acheminé vers la membrane plasmique. L'adressage et la reconnaissance du granule à la membrane plasmique se ferait grâce à la liaison entre Rab3A et l'un de ses effecteurs, RIM, ou encore grâce au complexe Rab27A/MyRIP/myosine V qui stabiliserait l'arrimage du granule. Les protéines du complexe SNARE (VAMP/synaptobrévine, SNAP25 et syntaxine) assureraient le relais entre recrutement et arrimage.

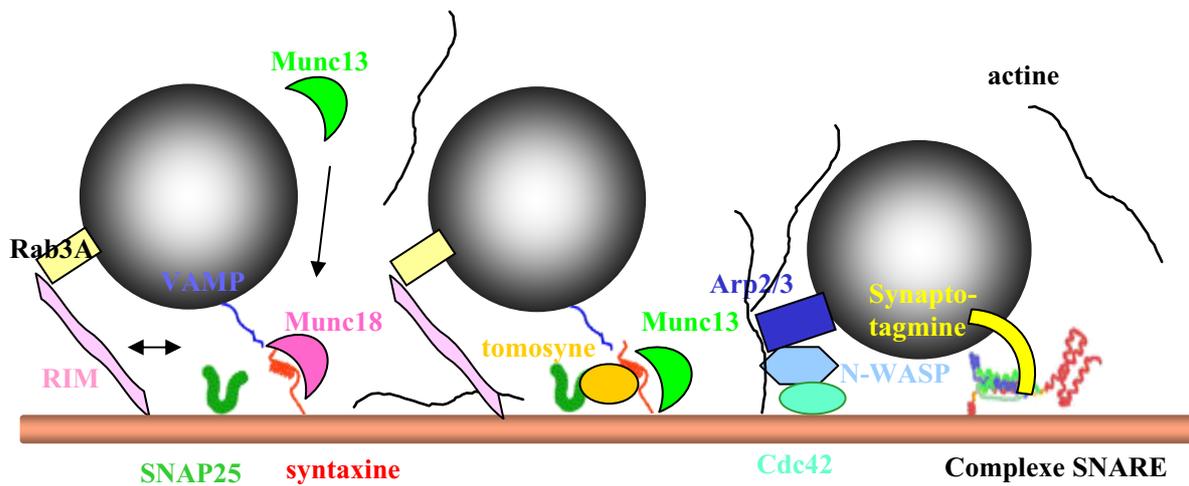
scindérine, qui coupe les filaments d'actine en petits fragments (Trifaro et al., 2000; Trifaro, 1999). Les mécanismes qui régissent l'adressage des granules à la membrane plasmique ne sont pas encore clairement identifiés. Plusieurs hypothèses ont été proposées, telles que l'intervention des GTPases monomériques Rab3A et Rab27A présentes sur les granules de sécrétion (Darchen et al., 1995; Desnos et al., 2003; Tsuboi and Fukuda, 2006). En effet, la surexpression de Rab3A ou Rab3D dans les cellules PC12 augmente la quantité de granules arrimés à la membrane plasmique, alors que l'expression de formes mutées de ces deux protéines produit l'effet inverse (Martelli et al., 2000). Pour permettre l'adressage, Rab3A pourrait faire intervenir son effecteur Rim ou les protéines SNARE (Darchen and Goud, 2000). Rab27A permettrait plutôt de relier le granule *via* la protéine MyRIP à la myosine Va, ce qui permettrait de diminuer la mobilité des granules à la périphérie cellulaire en les reliant à l'actine et de faciliter leur arrimage de manière stable. Ainsi, la réduction de l'expression de la Myosine Va s'accompagne-t-elle d'une réduction de la quantité de granules arrimés en périphérie cellulaire (Desnos et al., 2007; Desnos et al., 2003). La machinerie permettant le recrutement des granules à la membrane plasmique est donc particulièrement complexe (figure 4), ce qui implique une régulation spatiotemporelle très stricte.

### c) *L'arrimage et l'amorçage*

Une fois parvenus à la membrane plasmique, les granules vont s'y arrimer par l'intermédiaire d'un complexe multiprotéique appelé complexe SNARE (figure 5). Ce complexe regroupe la VAMP/synaptobrevine, la syntaxine et la SNAP25, qui forment des hétérotrimères. L'association de ce complexe se fait en *trans*, c'est-à-dire que les protéines SNARE des granules et de la membrane plasmique se trouvent parallèles, et permettent l'attachement d'une membrane à l'autre (Burgoyne and Morgan, 2003; Salaun et al., 2004b).

L'arrimage est un processus au cours duquel il y a association du granule de sécrétion à la membrane plasmique. Le passage de l'arrimage à l'amorçage serait dû à de simples changements d'interactions et/ou de conformation des différents partenaires, et il est possible que des étapes d'amorçage puissent avoir lieu au même moment que l'arrimage (figure 5). Par exemple, la synaptotagmine pourrait participer au couplage de l'entrée de calcium au processus d'exocytose mais aussi à l'amorçage, en consolidant les complexes SNARE (Chapman, 2002).

D'autres protéines comme Munc 13 ou Munc 18 agiraient également à l'interface entre arrimage et amorçage (Becherer and Rettig, 2006). Munc 13 stabiliserait la syntaxine dans une conformation ouverte permettant son association dans le complexe SNARE (Ashery et



**Figure 5 : L'arrimage et l'amorçage.**

Ces deux étapes sont particulièrement imbriquées l'une dans l'autre. Là encore, de nombreux partenaires interviendraient : Rab3A et RIM interagiraient avec les protéines SNARE, Munc 13 et Munc 18 agiraient sur la syntaxine pour permettre à cette dernière d'interagir avec les autres protéines SNARE. La tomosyne stabiliserait un complexe SNARE incomplet. Finalement l'intervention de la synaptotagmine permettrait aux complexes SNARE d'adopter une conformation « serrée ». La formation de nouveaux filaments d'actine par la cascade Cdc42/N-WASP/Arp2/3 pourrait jouer un rôle tout au long du processus.

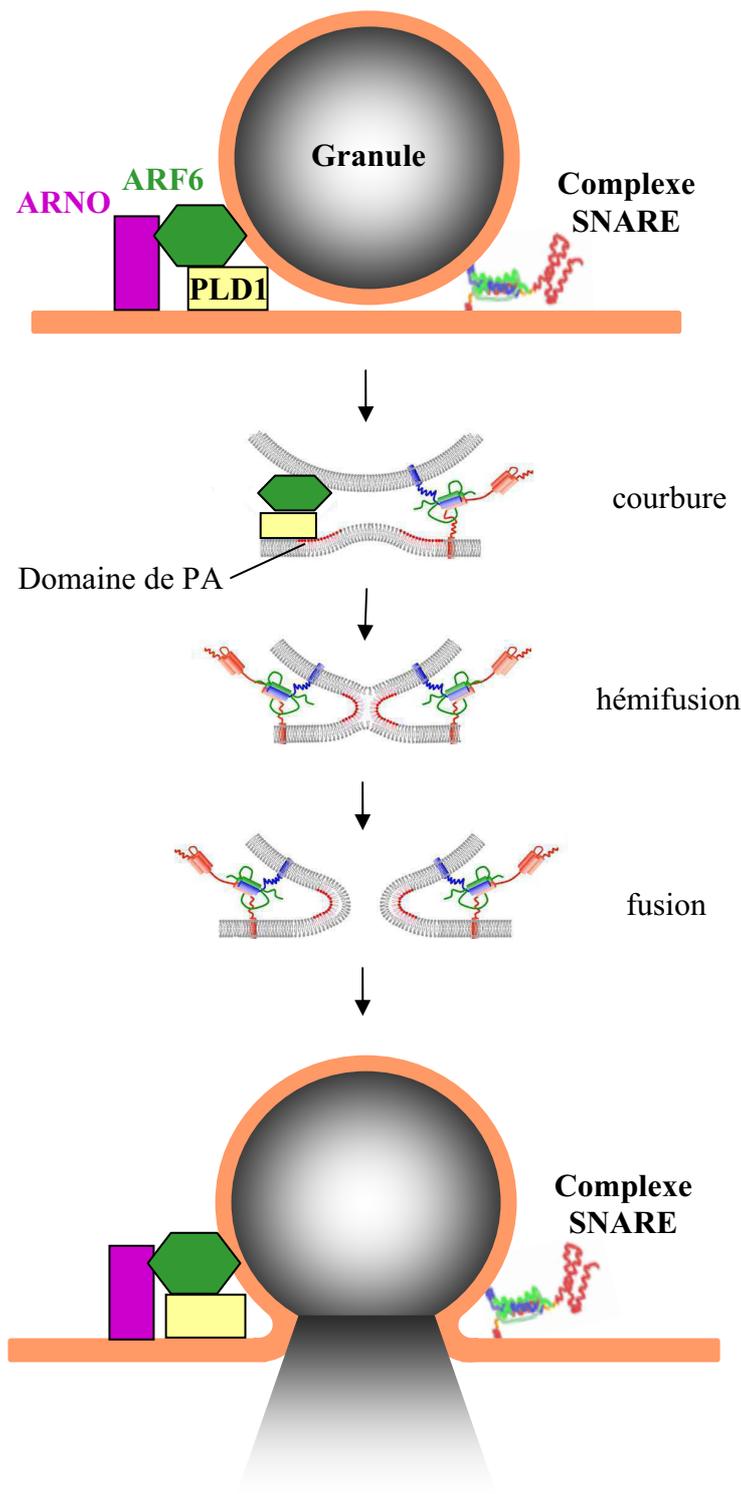
al., 2000). L'interaction entre Munc18 et la syntaxine 1 serait nécessaire à un arrimage subséquent des granules (Becherer and Rettig, 2006; Burgoyne and Morgan, 2003; Voets et al., 2001). En effet, il a pu être montré que dans des cellules chromaffines n'exprimant plus Munc 18-1, l'arrimage stable des granules est perturbé (Toonen et al., 2006). De plus l'arrimage n'est pas rétabli lorsqu'un mutant de Munc 18-1 ne liant plus la syntaxine 1 est exprimé dans ces mêmes cellules (Gulyas-Kovacs et al., 2007). Des études récentes montrent que Munc18 stimulerait également la fusion en interagissant directement avec le complexe SNARE assemblé (Dulubova et al., 2007; Shen et al., 2007).

Des protéines comme Cdc42 (GTPase de la famille des protéines Rho), N-WASP (Neuronal Wiskott Aldrich Syndrom Protein) ou les protéines du complexe Arp2/3 interviendraient dans la néopolymérisation de filaments d'actine qui assureraient alors l'arrimage des granules (Gasman et al., 2003; Gasman et al., 2004; Malacombe et al., 2006).

Il existe bien d'autres protéines susceptibles d'intervenir dans les étapes d'arrimage et d'amorçage : Rab3 et la protéine RIM, capables d'interagir avec les protéines SNARE et Munc13 (Schoch and Gundelfinger, 2006) ; la tomosyne, qui lie la SNAP25 et la syntaxine en empêchant leur association en complexes SNARE complets (Hatsuzawa et al., 2003) ; ou encore les complexines, qui permettraient de stabiliser les complexes SNARE formés et seraient déplacées par la synaptotagmine lors du déclenchement de la fusion (Giraud et al., 2006). Toutefois, les rôles précis de ces protéines restent encore à déterminer (Becherer and Rettig, 2006).

#### *d) La fusion*

L'étape de fusion nécessite la formation d'un pore reliant l'intérieur du granule au milieu extracellulaire, dont l'extension permettrait la libération du contenu granulaire (figure 6). Il existe deux types de fusion du granule avec la membrane plasmique. Le premier mode consiste en l'incorporation de la totalité de la membrane granulaire dans la membrane plasmique, et est donc désigné sous le terme de fusion complète. Le second est une fusion partielle du granule avec la membrane appelé cavapture : le pore de fusion s'ouvre et se referme, ne permettant ainsi que la libération d'une partie du contenu granulaire. Le pore une fois refermé, le granule pourrait ainsi être disponible pour une nouvelle phase de libération (Harata et al., 2006). L'existence de ces deux types de fusion pourrait permettre la régulation de l'intensité de la réponse à une stimulation. Les granules chromaffines contenant à la fois de petites molécules comme les catécholamines et des peptides qui sont sous la forme d'une



**Figure 6 : La fusion membranaire.**

La protéine ARNO activerait ARF6 en réalisant l'échange de GDP contre du GTP. ARF6 activerait alors la PLD1, qui catalyserait la transformation de PC en PA dans le feuillet interne de la membrane plasmique. Ceci permettrait la courbure de cette dernière et favoriserait l'hémifusion puis la fusion des membranes plasmique et granulaire, pour permettre la libération des produits de sécrétion.

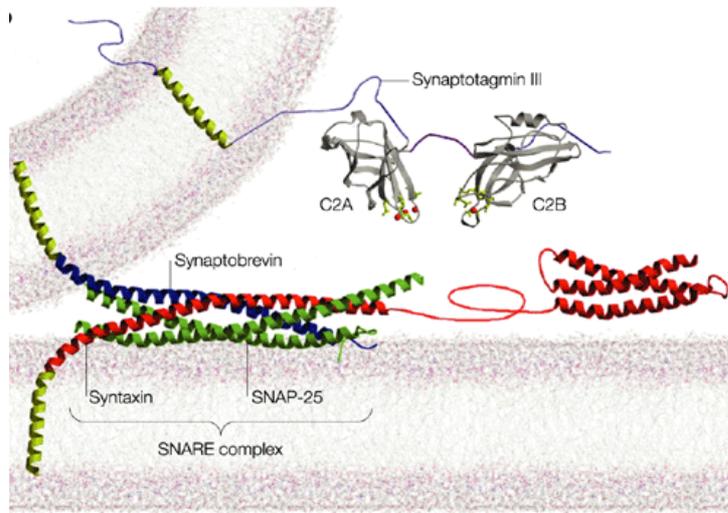
matrice gélifiée, la cavapture pourrait constituer un moyen de retenir sélectivement les molécules trop volumineuses et de ne sécréter que celles pouvant passer par le pore de fusion. Plus la stimulation est intense, plus les cellules utilisent la fusion totale (Elhamdani et al., 2006) qui permettrait alors de libérer tout le contenu du granule, induisant des effets physiologiques plus larges (Fulop et al., 2005).

Au laboratoire, le rôle de la cascade protéique ARNO/ARF6/phospholipase D1 (PLD1) a pu être mis en évidence au cours de l'étape de fusion (Vitale et al., 2001; Vitale et al., 2002). ARNO et la PLD1 sont localisées à la membrane plasmique, et ARF6 est une GTPase monomérique située sur la membrane granulaire (Vitale et al., 2002). Lorsque les granules sont arrimés, ARF6 se trouve au contact de sa GEF (Guanine nucleotide exchange factor), ARNO, qui échange le GDP lié à la GTPase contre du GTP, aboutissant à une conformation active de la GTPase. Ceci permet à ARF6 d'activer la PLD1 (Vitale et al., 2002). La PLD1 catalyse la transformation de phosphatidyl-choline (PC) en choline et en acide phosphatidique (PA) qui est essentiel au processus d'exocytose (Cockcroft et al., 2002; Zeniou-Meyer et al., 2007). En effet, PC et PA sont des lipides du feuillet cytoplasmique de la membrane plasmique. La PC est cylindrique alors que le PA est conique. La production localisée de PA favoriserait donc la courbure de la membrane et permettrait la fusion (Du et al., 2003; Zeniou-Meyer et al., 2007; Zimmerberg and Chernomordik, 1999). La PLD1 aurait ainsi un rôle dans la formation du pore de fusion en réduisant la barrière énergétique empêchant une fusion spontanée des membranes. La protéine GIT1 inactiverait Arf6 et stopperait donc l'activation de la PLD1 pour mettre fin au processus de sécrétion (Meyer et al., 2006).

Récemment, l'hypothèse d'un pore de fusion protéo-lipidique a également été émise, selon laquelle les parois du pore initial seraient formées par les protéines SNARE. L'expansion du pore se produirait ensuite de la même façon que dans le modèle purement lipidique (Jackson and Chapman, 2006). Cependant, la nature exacte des pores de fusion n'est pas encore clairement déterminée, dans la mesure où l'étude des étapes très précoces de leur formation constitue une difficulté technique majeure (Jackson and Chapman, 2006).

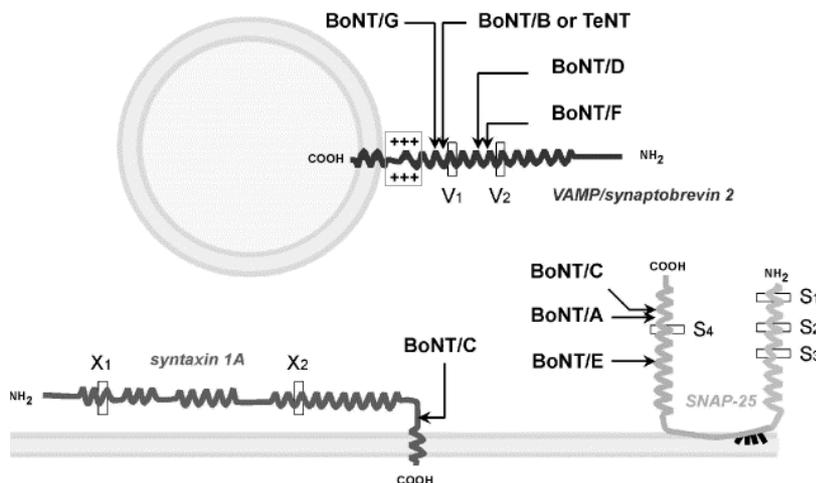
#### *e) Conclusion*

L'exocytose est un processus complexe, faisant intervenir un grand nombre de partenaires protéiques et lipidiques et ayant pour but d'amener les granules à sécréter leur contenu à l'extérieur de la cellule. Le découpage en étapes successives est un moyen de faciliter la compréhension du phénomène, mais il faut souligner qu'il est arbitraire : en effet, pour que le processus puisse se dérouler avec un minutage optimal, les différentes phases sont imbriquées



**Figure 7 : Les protéines du complexe SNARE.**

Le complexe SNARE est composé de la syntaxine, de la SNAP25, et de la VAMP2/synaptobrevine. Les hélices  $\alpha$  des domaines SNARE de ces trois protéines s'associent *en trans* pour former le cœur du complexe, qui permet le rapprochement de la membrane granulaire et de la membrane plasmique. (Chapman, 2002)



**Figure 8 : Les toxines clostridiales, des outils d'étude des protéines SNARE.**

Les toxines clostridiales regroupent la toxine tétanique (TeNT) et 7 sérotypes de toxines botuliques (BoNT/A à G). Ces toxines sont capables de cliver spécifiquement les protéines du complexe SNARE et constituent donc des outils très intéressants pour étudier le rôle de ces protéines dans l'exocytose. Les sites de clivages sont indiqués par les flèches. Les régions encadrées (V1, V2, X1, X2, et S1 à S4, +++) correspondent aux sites spécifiques de liaison des chaînes légères des toxines. (Humeau et al., 2000)

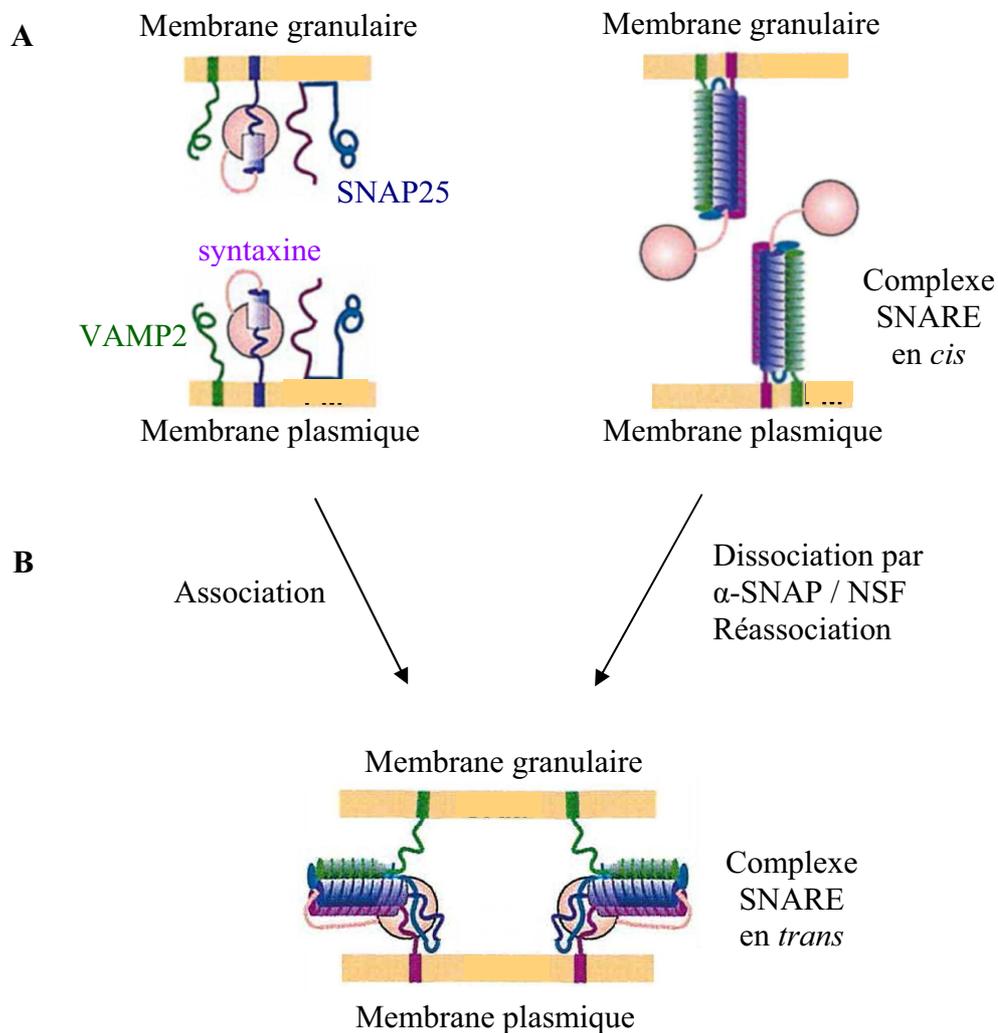
les unes dans les autres, et un certain nombre d'acteurs peuvent jouer des rôles multiples tout au long du processus. Ainsi les protéines du complexes SNARE participeraient à l'arrimage et à l'amorçage, mais également à la formation du pore de fusion (Jackson and Chapman, 2006). Il en est de même pour le cytosquelette, et en particulier pour l'actine, qui intervient dans la quasi-totalité des étapes (Malacombe et al., 2006). La régulation spatio-temporelle de l'exocytose est donc un élément-clef permettant le bon fonctionnement de la machinerie dans son ensemble.

### **5) Zoom sur les protéines du complexe SNARE**

Comme nous l'avons évoqué au cours du paragraphe 4c, le complexe SNARE regroupe 3 protéines : la syntaxine, la SNAP25, et la VAMP/synaptobrevine (figure 7). Ces trois protéines comportent des domaines en hélice  $\alpha$  (1 domaine pour la VAMP et pour la syntaxine, et 2 domaines pour SNAP25) qui s'associent à la manière d'une fermeture éclair, permettant le rapprochement des membranes plasmique et granulaire (Burgoyne and Morgan, 2003; Montecucco et al., 2005; Salaun et al., 2004a; Stojilkovic, 2005). Il existe plusieurs isoformes de chacune des protéines SNARE : chez les mammifères on trouve 15 isoformes de la syntaxine, dont 4 impliquées dans l'exocytose (syntaxines 1 à 4), au moins trois isoformes de la SNAP25 (SNAP25 A et B, SNAP23) et plus de 7 isoformes de VAMP (Salaun et al., 2004b; Teng et al., 2001; Yang et al., 1999).

La découverte du mode d'action des toxines clostridiales comme les toxines botuliques et la toxine tétanique (produites par des bactéries du genre *Clostridium*) a permis la compréhension des interactions protéiques du complexe SNARE (Humeau et al., 2000). Ces toxines sont constituées de deux chaînes protéiques liées par un pont dissulfure : la chaîne lourde permet l'entrée de la toxine dans les cellules, et la chaîne légère est une métalloendopeptidase à zinc exerçant une activité protéolytique sur les protéines SNARE (figure 8). Les toxines botuliques (7 sérotypes : BoNT/A à G) clivent une ou plusieurs des protéines du complexe SNARE, alors que la toxine tétanique (TeNT) clive sélectivement la VAMP2 (Humeau et al., 2000). L'utilisation de ces toxines a permis de montrer que les complexes SNARE sont impliqués dans les étapes tardives de l'arrimage et/ou dans la fusion (Humeau et al., 2000; Schiavo et al., 1994).

La localisation des protéines SNARE n'est pas aussi stricte que ce qui a été décrit : en effet, la SNAP25 et la syntaxine 1, définies initialement comme des t-SNARE (target-SNARE localisées à la membrane plasmique), sont également présentes sur la membrane des granules



**Figure 9 : La localisation et le mode d'association des protéines SNARE.**

**A)** Les trois protéines du complexe SNARE peuvent être présentes sur la membrane du granule ou sur la membrane plasmique. Dans les cellules au repos, ces protéines se trouvent soit sous forme libre, soit sous forme de complexe en *cis*.

**B)** Lors de la stimulation, il peut y avoir : association des SNARE sous forme libre directement en complexes *trans* ; ou alors les complexes *cis* sont dissociés par les protéines  $\alpha$ -SNAP et NSF, et ensuite les protéines SNARE sont réassociées en complexes *trans*.

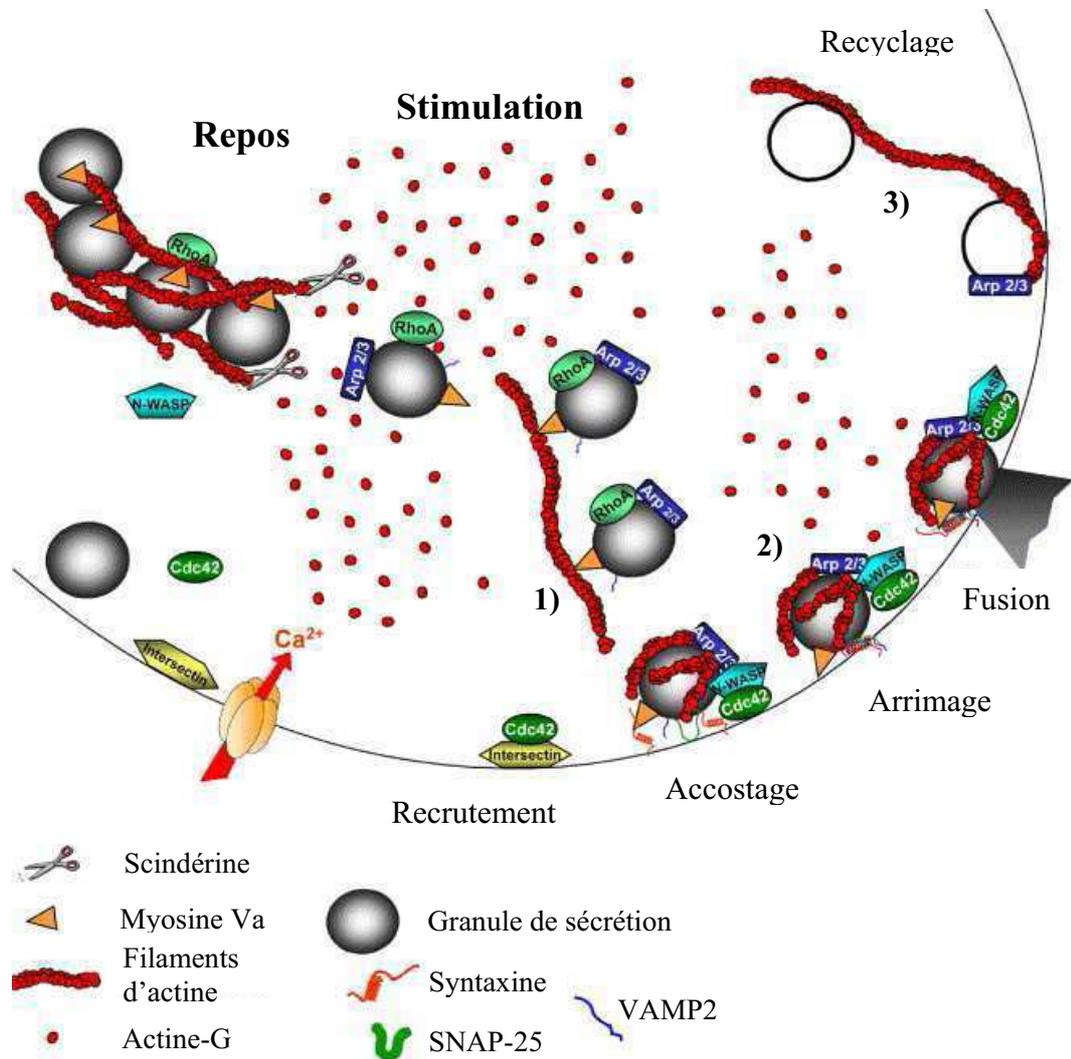
D'après (De Blas et al., 2005)

dans les cellules chromaffines (Burgoyne and Morgan, 1998a; Tagaya et al., 1996; Tagaya et al., 1995; Yoo et al., 2005) alors que la VAMP2 définie initialement comme une v-SNARE (vesicular-SNARE) est présente en partie à la membrane plasmique (résultats, chapitre 2). L'association des protéines des membranes granulaire et plasmique se fait en configuration *trans*, mais les complexes peuvent aussi adopter une configuration *cis* lorsque les trois protéines se trouvent dans la même membrane (figure 9). Dans les membranes de cellules au repos, les protéines SNARE pourraient exister soit sous forme libre soit en complexe *cis* (Burgoyne and Morgan, 1998a; Tagaya et al., 1996; Tagaya et al., 1995; Yoo et al., 2005). Ainsi, dans des feuillettes de membrane plasmique de cellules PC12, des complexes *cis* regroupant les trois protéines SNARE ont pu être observés (Lang et al., 2002).

Lors de la stimulation, la dissociation des complexes SNARE en *cis* dans les deux compartiments membranaires serait nécessaire pour autoriser leur association en *trans* et donc l'arrimage des granules (figure 9). Récemment, des protéines de dissociation du complexe SNARE comme l'ATPase NSF (N-ethylmaleimide-Sensitive Factor) et les protéines SNAP (Soluble NSF Attachment Proteins), ont été impliquées dans cette étape (Burgoyne and Morgan, 1998a; Burgoyne and Morgan, 2003). Une étude réalisée sur les spermatozoïdes lors de l'exocytose de l'acrosome montre que des complexes en *cis* sont présents à la fois sur la membrane plasmique et sur la membrane acrosomale. La stimulation provoque la dissociation de ces complexes par NSF/ $\alpha$ -SNAP et une association lâche des SNARE en *trans*, permettant ainsi l'arrimage de l'acrosome à la membrane plasmique (De Blas et al., 2005).

Pendant longtemps, la communauté scientifique a été séduite par l'idée que le rapprochement des membranes par le complexe SNARE en *trans* lors de l'arrimage puis la dissociation de ce complexe seraient suffisants pour entraîner la fusion des membranes. Cependant, un tel rôle est bien vaste pour être attribué aux seules protéines SNARE, et de plus un nombre toujours croissant de protéines est impliqué dans le processus sécréteur (Burgoyne and Morgan, 1998a; Gasman et al., 2003; Hanson et al., 1997). Les protéines SNARE pourraient donc constituer la machinerie « minimale » de l'exocytose, qui serait régulée par de nombreux partenaires ayant des effets synergiques ou antagonistes.

Après la fusion de la membrane granulaire avec la membrane plasmique, les complexes SNARE se trouvent à nouveau en configuration *cis* dans la membrane plasmique. La dissociation de ces complexes grâce à l'intervention des protéines  $\alpha$ -SNAP et NSF permettrait alors le recyclage des protéines qui le composent (Montecucco et al., 2005).



**Figure 10 : Rôle du cytosquelette d'actine dans l'exocytose.**

Le cytosquelette d'actine cortical constitue une barrière empêchant l'accès des granules à la membrane plasmique dans les cellules au repos. Lors de la stimulation, des filaments d'actine pourraient intervenir au cours des différentes phases : **1)** permettre l'acheminement des granules à la périphérie cellulaire ; **2)** faciliter les étapes tardives de l'exocytose (de l'arrimage à la fusion) grâce à la néopolymérisation de filaments d'actine sur le granule par la cascade Cdc42/N-WASP/Arp2/3 ; **3)** participer au recyclage de la membrane granulaire. (Malacombe et al., 2006)

## 6) Le cytosquelette et l'exocytose

Les microtubules et les filaments d'actine sont deux éléments du cytosquelette impliqués tout au long du processus sécréteur, dont la coopération et la coordination sont indispensables au bon déroulement de l'exocytose (Neco et al., 2003).

La stabilisation ou la dépolymérisation des microtubules affecte la sécrétion dans les cellules chromaffines (Poisner and Bernstein, 1971). En effet, les drogues affectant les microtubules inhibent la sécrétion de catécholamines au cours des phases lentes d'exocytose et lors de stimulations répétées. Elles réduisent également la mobilité des granules dans le cytoplasme (Neco et al., 2003). Il semble donc qu'un réseau de microtubules intacts soit nécessaire à l'acheminement des granules en périphérie cellulaire, pour reconstituer le stock de granules de réserve piégés par le réseau d'actine sous-cortical ou pour alimenter le processus sécréteur dans le cas de stimulations prolongées ou répétées (Rudolf et al., 2001). Le déplacement des granules le long des microtubules se fait grâce à des moteurs moléculaires, notamment les kinésines (Brown, 1999). Lors de l'arrivée des granules à la périphérie cellulaire, les microtubules passent le relais au cytosquelette d'actine (Brown, 1999; Desnos et al., 2007; Neco et al., 2003). La coopération entre les différents moteurs moléculaires (en particulier la kinésine I et la myosine Va) serait responsable du passage d'un type de cytosquelette à l'autre (Brown, 1999; Desnos et al., 2007).

Dans les cellules chromaffines au repos, l'actine est organisée en un réseau dense de filaments dans l'espace subplasmalemmal, ce qui constitue une barrière physique empêchant le déplacement des granules vers la périphérie cellulaire, contrôlant ainsi la population de granules rapidement libérables (Aunis and Bader, 1988; Malacombe et al., 2006; Vitale et al., 1995). Lors d'une stimulation, ce réseau cortical doit être réorganisé pour permettre aux granules d'accéder à la membrane. La scindérine a été impliquée dans cette étape : en effet il a été montré que le clivage des filaments d'actine par cette protéine favorise l'exocytose (Zhang et al., 1996). Toutefois, il semble de plus en plus évident que cette réorganisation ne se limiterait pas à la levée de la barrière d'actine mais elle aurait également un rôle plus dynamique et même promoteur de la sécrétion (figure 10). Ce phénomène a été mis en évidence grâce à l'utilisation de toxines entraînant la dépolymérisation de l'actine-F : des doses modérées de ces agents entraînent une augmentation de l'exocytose, mais des doses plus importantes sont en revanche inhibitrices de la sécrétion (Gasman et al., 2004; Malacombe et al., 2006; Pendleton and Koffer, 2001).

Un premier rôle de l'actine dans le guidage des granules jusqu'à la membrane plasmique a été mis en évidence grâce à la diminution de la mobilité des granules provoquée par la dépolymérisation ou la déstructuration du cytosquelette d'actine (Allersma et al., 2006; Lang et al., 2000; Oheim and Stuhmer, 2000). Ces filaments d'actine constitueraient des rails, le long desquels les granules pourraient se déplacer grâce à des moteurs moléculaires. Un rôle régulateur par la myosine V a pu être mis en évidence : en effet cette protéine est associée aux granules de sécrétion, par le biais d'une interaction moléculaire avec MyRIP qui elle-même lie la GTPase Rab27A située sur les granules, et il a été montré que ce complexe moléculaire est capable de réguler les mouvements des granules à proximité de la membrane plasmique (Desnos et al., 2003; Rudolf et al., 2003).

D'autres études ont permis de montrer qu'une néopolymérisation de filaments d'actine se produit au cours de l'exocytose (Norman et al., 1994; Sankaranarayanan et al., 2003; Valentijn et al., 2000). En particulier, la cascade Cdc42, N-WASP et Arp2/3 a été impliquée dans la formation *de novo* de filaments d'actine au niveau des sites d'arrimage des granules (Gasman et al., 2004), ce qui suggère également un rôle pour ces filaments dans des étapes plus tardives de l'exocytose que le recrutement des granules. Ces filaments d'actine néoformés pourraient agir de différentes façons : ils pourraient former une structure « en filet » autour des granules pour permettre un meilleur arrimage ; ils pourraient également, en conjonction avec des protéines motrices, notamment la myosine II (Neco et al., 2004), augmenter la force de compression sur les granules pour achever ou potentialiser l'expulsion du contenu granulaire ; une troisième hypothèse est celle d'une régulation du pore de fusion, par exemple en influant sur les proportions de cavapture par rapport à la fusion complète ; enfin, les filaments d'actine pourraient aussi permettre un couplage entre exocytose et endocytose (Malacombe et al., 2006).

## **7) Conclusion**

Au cours de ce chapitre, nous avons pu voir que l'exocytose est un phénomène très complexe, faisant intervenir un grand nombre d'acteurs protéiques susceptibles d'intervenir lors d'une ou plusieurs étapes du processus. Il semble donc indispensable qu'il y ait un chef d'orchestre pour coordonner les différents mouvements des granules avec l'organisation du cytosquelette, et permettre ainsi la régulation spatiotemporelle de la machinerie de sécrétion, pour que les différentes étapes se déroulent dans le bon ordre et au bon endroit. Intuitivement, un tel chef d'orchestre devrait présenter une large palette d'interactions protéiques et

lipidiques, pour intervenir aux différents niveaux du processus. Ainsi les annexines, protéines sensibles au calcium, liant les phospholipides, l'actine, et un grand nombre de partenaires protéiques (Gerke et al., 2005; Gerke and Moss, 2002), semblent être de très bonnes candidates pour organiser la machinerie d'exocytose.

Name	Synonyms/Former name(s)	Human gene symbol	Non-human gene symbol	
annexin A1	lipocortin 1, annexin I	ANXA1	Anxa1	
annexin A2	calpactin 1, annexin II	ANXA2	Anxa2	
annexin A3	annexin III	ANXA3	Anxa3	
annexin A4	annexin IV	ANXA4	Anxa4	
annexin A5	annexin V	ANXA5	Anxa5	
annexin A6	annexin VI	ANXA6	Anxa6	
annexin A7	synexin, annexin VII	ANXA7	Anxa7	
annexin A8	annexin VIII	ANXA8	Anxa8	
annexin A9	annexin XXXI	ANXA9	Anxa9	
annexin A10		ANXA10	Anxa10	
annexin A11	annexin XI	ANXA11	Anxa11	
annexin A12	<i>unassigned</i>			
annexin A13	annexin XIII	ANXA13	Anxa13	

Name	Organism/Former name	Gene symbol	
annexin B9	3 species of insect, annexin IX	Anxb9	ANIMAL ANNEXINS without HUMAN ORTHOLOGS
annexin B10	4 species of insect, annexin X	Anxb10	
annexin B11	1 species of insect, annexin	Anxb11	
annexin B12	<i>Cnidaria</i> , annexin XII	Anxb12	
	3 species of flatworms, 5 annexins		
	10 species of roundworms, 5 annexins (including <i>C.elegans</i> annexins XV-XVII,XXX)		

Name	Organism/Former name	Gene symbol	
annexin C1	<i>Dictyostelium</i> and <i>Neurospora</i> annexin XIV	Anxc1	FUNGI/MOLDS and CLOSE RELATIVES
annexin C2-C5	4 species of fungi/molds/alveolates	Anxc2-c5	

Name	Organism/Former name	Gene symbol	
annexin D1-D25	35 species including annexin XVIII and annexins XXII-XXIX	Anxd1-d25	PLANTS

Name	Organism/Former name	Gene symbol	
annexin E1	<i>Giardia</i> annexin XXI	Anxe1	PROTISTS
annexin E2	<i>Giardia</i> annexin XIX	Anxe2	
annexin E3	<i>Giardia</i> annexin XX	Anxe3	

**Tableau 2 : La nomenclature de la superfamille des annexines.**

Les annexines sont représentées dans la presque totalité du monde vivant. Elles sont regroupées en 5 familles : la famille A correspond aux annexines de vertébrés, et les familles B à E comportent respectivement les annexines d'invertébrés, de champignons ou d'eucaryotes unicellulaires, de plantes, et finalement de protistes. Pour chaque famille sont indiqués les représentants les plus étudiés, avec la nomenclature actuelle et les anciens noms correspondants (Gerke and Moss, 2002).

## **B. Les annexines et l'exocytose**

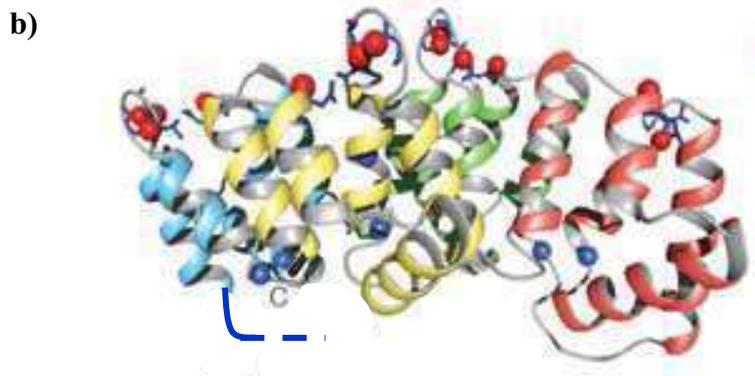
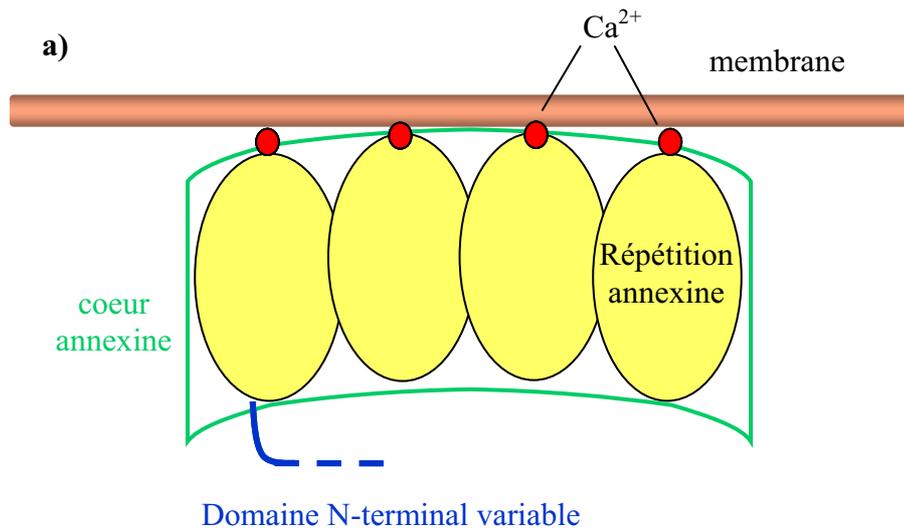
L'intervention des annexines dans l'exocytose a été envisagée depuis un quart de siècle environ (Gerke and Moss, 2002), c'est à dire avant même la découverte des protéines du complexe SNARE. Par ailleurs, de nombreuses études ont impliqué des annexines dans les mécanismes de liaison et de fusion de membranes (Gerke et al., 2005). L'annexine A7 a été la première annexine à laquelle les chercheurs se sont intéressés, en raison de sa capacité à agréger les granules chromaffines entre eux (Creutz et al., 1978). Par la suite, d'autres annexines, en particulier l'annexine A2, ont été mises en évidence au cours de l'exocytose. Avant de détailler les résultats concernant l'intervention de l'annexine A2 lors de la sécrétion des catécholamines, je présenterai la structure et les fonctions des annexines de manière générale.

### **I) Les annexines, une famille de protéines très conservées dans l'évolution.**

#### **1) La classification et la nomenclature des annexines**

Les différentes annexines ont été découvertes il y a une trentaine d'années, indépendamment les unes des autres. A l'origine, des noms très variés leur ont été attribués, en fonction de leurs propriétés : on trouvait la synexine, protéine agrégeant les granules chromaffines (Creutz et al., 1978), les chromobindines liant les granules chromaffines (Creutz et al., 1983), les calcimédines médiant la signalisation par le calcium (Moore et al., 1984), les lipocortines inductibles par les stéroïdes et inhibant des lipases (Flower and Rothwell, 1994), ou encore les calpactines, protéines de liaison au calcium, aux phospholipides et à l'actine (Glenney et al., 1987). Par la suite, des caractéristiques communes ont été identifiées, permettant le regroupement de ces différentes protéines au sein d'une superfamille (Crompton et al., 1988; Gerke and Moss, 2002).

A l'heure actuelle, il existe plus de 160 annexines, réparties dans plus de 65 espèces différentes balayant la quasi totalité du monde vivant. Les annexines sont classées en 5



**Figure 11 : La structure générale des annexines.**

**a)** Le cœur annexine comporte 4 répétitions annexines organisées en une structure plane légèrement incurvée. A la surface convexe du cœur se trouvent les sites de liaison au calcium et aux phospholipides. Le domaine N-terminal, variable et spécifique de chaque annexine, est exposé du côté concave du cœur.

**b)** Cette représentation tridimensionnelle présente une annexine dans la même configuration que sur le schéma a). Les 4 répétitions annexine du cœur sont représentées chacune dans une couleur différente, avec l'organisation des 5 hélices  $\alpha$  qui les composent.

D'après (Gerke et al., 2005)

familles (tableau 2) : les Annexines A, au nombre de douze, sont spécifiques des vertébrés (annexines A1 à A13, la nomenclature A12 n'ayant pas été attribuée). La famille B regroupe les annexines d'invertébrés (annexines B1 à B14). Les annexines de champignons et de certains eucaryotes unicellulaires forment la famille C (annexines C1 à C9), celles des plantes, la famille D (annexines D1 à D25), et pour finir, les annexines E sont retrouvées chez les protistes (annexines E1 à E7) (Moss and Morgan, 2004).

## 2) La structure des annexines

### *a) Le domaine C-terminal possède les caractéristiques structurales communes à toutes les annexines*

Par définition, toutes les annexines remplissent deux conditions majeures : elles sont capables de se lier aux phospholipides de manière dépendante du calcium et elles possèdent une partie désignée sous le terme de « cœur » (Annexin core) située dans la partie C-terminale de la protéine. Ce cœur est constitué de 4 (8 dans le cas de l'annexine A6) « répétitions annexine » (Annexin repeat), qui sont des séquences d'environ 70 acides aminés constituées de 5 hélices  $\alpha$  et contenant un domaine nommé repliement endonexine, particulièrement bien conservé au cours de l'évolution (Gerke and Moss, 2002; Moss and Morgan, 2004).

La structure tridimensionnelle du cœur est, elle aussi, remarquablement conservée : les 4 « répétitions annexines » sont organisées en super-hélice, formant une structure plane légèrement incurvée, qui présente sur la face convexe les sites de liaison aux ions calcium et aux phospholipides (figure 11). La face concave, elle, peut interagir par liaison hydrophobe avec la partie N-terminale de la protéine et avec différents partenaires cytosoliques (Gerke and Moss, 2002; Moss and Morgan, 2004). La présence de sites de liaison au calcium confère aux annexines un rôle de senseur calcique particulièrement important (Monastyrskaya et al., 2006). Dans ce paragraphe, je décrirai la structure des sites de liaison au calcium, aux phospholipides, puis à l'actine.

#### - les sites de liaison au calcium

Toutes les annexines possèdent deux sortes de sites de liaison au calcium : des sites de type II, de forte affinité pour le calcium, et d'autres de type III, qui requièrent une concentration calcique dix fois plus importante, environ 100  $\mu\text{M}$  (Jost et al., 1994). Le nombre et l'organisation des sites de liaison au calcium n'est pas identique pour toutes les annexines. Par exemple, l'annexine A5 présente deux sites de liaison de type III dans la

répétition I et un site de type II dans chacune des répétitions annexine (Jost et al., 1994), alors que la première répétition de l'annexine A2 ne contient pas de site de type II (Burger et al., 1996; Gerke et al., 2005; Jost et al., 1992; Jost et al., 1994; Monastyrskaya et al., 2006). Tous les sites de liaison au calcium se trouvent dans la partie convexe du cœur, tout comme les sites de liaison aux lipides. Ainsi, les différences observées dans le nombre et la répartition des sites de liaison au calcium pourraient être à l'origine des variations d'affinité pour le calcium entre les différentes annexines (Gerke et al., 2005; Jost et al., 1994).

- les sites de liaison aux phospholipides

Comme nous l'avons déjà évoqué, toutes les annexines sont capables de lier des phospholipides en présence de calcium, en particulier les phospholipides acides portant des charges négatives, comme l'acide phosphatidique, la phosphatidyl-sérine, ou le phosphatidyl-inositol (Raynal and Pollard, 1994). La nature des phospholipides liés varie d'une annexine à l'autre et pourrait expliquer en partie la différence de localisation et de rôles de chacune des protéines de cette famille (Gerke et al., 2005). En effet, les phospholipides ne sont pas répartis de manière uniforme dans les différents organites cellulaires : la liaison préférentielle d'une annexine avec un type de phospholipide lui permettrait d'être associée aux compartiments enrichis en ce phospholipide (Gerke and Moss, 2002). Par exemple, dans des cellules HeLa, le cœur de l'annexine A1 fusionné à la GFP est localisé spécifiquement dans le compartiment endosomal tardif, celui de l'annexine A4 semble associé à un compartiment non-endosomal, et celui de l'annexine A2 est cytoplasmique et en partie nucléaire (Rescher et al., 2000). Ainsi le cœur, bien que très conservé, pourrait, par ses capacités propres, cibler un compartiment cellulaire précis.

Des modes d'interaction « atypiques » entre les annexines et les phospholipides, non-dépendants du calcium, ont également été décrits (Gerke and Moss, 2002). Par exemple, un mutant de l'annexine A2 dont tous les sites de liaison au calcium ont été modifiés est capable de lier des vésicules contenant de la phosphatidyl-sérine *in vitro* (Filipenko et al., 2000). Une autre étude a permis de montrer que le cholestérol régule l'association de l'annexine A2 à la phosphatidyl-sérine en absence de calcium (Ayala-Sanmartin et al., 2001). Dans certains cas, il semblerait que ce type d'interactions dépende en grande partie du pH. En effet, l'annexine A5 se lie à la phosphatidyl-sérine indépendamment du calcium à pH 4, mais cette interaction nécessite du calcium à pH 7 (Kohler et al., 1997). L'annexine A2 tétramérique et l'annexine A6 peuvent également lier les membranes plasmiques indépendamment du calcium à pH 6,6 (Monastyrskaya et al., 2007). L'intérêt physiologique de ces interactions aux lipides

indépendantes du calcium n'est pas encore très clair. Il a été proposé qu'elles permettent l'insertion d'annexines dans les membranes (Golczak et al., 2001) ou leur extrusion vers l'extérieur de la cellule (Gerke and Moss, 2002).

- la liaison à l'actine

Plusieurs annexines ont aussi la capacité de se lier à l'actine, en particulier sous sa forme filamenteuse (actine-F) (Hayes et al., 2004b). Par exemple l'annexine A5 interagit avec l'isoforme  $\gamma$  de l'actine (Tzima et al., 2000) et les annexines A1 et A6 lient l'actine-F (Babiychuk et al., 1999; Gerke and Moss, 2002; Hayes et al., 2004b). L'annexine A2 est également capable d'interagir avec l'actine-F et son site de liaison consiste en une séquence de 9 acides aminés située à l'extrémité C-terminale de la protéine (Filipenko and Waisman, 2001). Curieusement, ce site est conservé dans d'autres annexines comme l'annexine A4 qui pourtant ne lie pas l'actine. Il doit donc exister d'autres éléments, pour l'instant non déterminés, régissant l'interaction entre les annexines et l'actine (Hayes et al., 2004b).

*b) Le domaine N-terminal est spécifique de chaque annexine*

La région N-terminale des annexines, moins structurée que le domaine C-terminal, varie en séquence et en longueur selon le type d'annexine : elle peut être composée d'environ 15 à 200 acides aminés et cette diversité expliquerait en partie la grande variété des fonctions assurées par les annexines. Cette région est capable de réguler les propriétés du « cœur » : par exemple la localisation nucléaire du cœur de l'annexine 2 disparaît lorsque l'annexine A2 est complète puisque la partie N-terminale de la protéine comporte une séquence d'exportation nucléaire responsable de sa translocation hors du noyau (Rescher et al., 2000). La région N-terminale est souvent la cible de modifications post-traductionnelles, telles que des phosphorylations ou des myristoylations (Gerke and Moss, 1997). De plus, certaines annexines possèdent dans cette région des domaines de liaison à des partenaires moléculaires contenant des domaines de liaison au calcium de type motifs « EF-hand », dont font partie les protéines S100. Par exemple, l'annexine A1 peut se lier à la protéine S100A11 (Mailliard et al., 1996) ; l'annexine A2, aux protéines S100A10 et S100A11 (Rety et al., 1999; Rintala-Dempsey et al., 2006) ; l'annexine A11, à S100A6 (Tokumitsu et al., 1992) ; et l'annexine A7 interagit avec la sorcine, une protéine à « EF-hand » (Brownawell and Creutz, 1997). En absence de calcium, le domaine N-terminal des annexines est associé à la partie concave du « cœur ». Il semblerait que la liaison du calcium sur ce « cœur » provoque des changements

de conformation, libérant ainsi le domaine N-terminal qui pourrait alors se lier aux différents partenaires (Gerke et al., 2005; Gerke and Moss, 2002).

### **3) La localisation des annexines**

Les annexines ont des distributions cellulaires variées, et cyclent souvent entre une localisation cytoplasmique et une association aux membranes, en fonction de la présence de calcium. Souvent, les annexines ont été trouvées associées à la membrane plasmique, aux membranes de l'appareil de Golgi, du réticulum endoplasmique ou des endosomes, suggérant un rôle dans le trafic entre ces différents compartiments (Gerke and Moss, 1997; Gerke and Moss, 2002).

Certaines annexines sont présentes dans le noyau. Dans des cellules épithéliales humaines, l'annexine A11 est une protéine du nucléoplasme, qui en présence de calcium, s'associe à la membrane nucléaire en prophase et en fin de télophase (Tomas and Moss, 2003). L'annexine A5 semble aussi être relocalisée dans le noyau sous l'effet d'un stress oxydatif, ce qui suggère que cette protéine pourrait jouer un rôle dans la modulation de l'expression génique (Sacre and Moss, 2002). L'annexine A2 comporte une séquence d'exportation nucléaire dans sa partie N-terminale (résidus 3 à 12) mais la modification de son état de phosphorylation semble constituer un signal permettant son entrée dans le noyau. La formation du tétramère annexine A2-S100A10 en revanche n'a lieu qu'à l'extérieur du noyau (Eberhard et al., 2001).

Les annexines ne possèdent pas de signal d'exportation permettant leur libération hors des cellules par une voie de sécrétion classique, cependant plusieurs d'entre elles ont été identifiées dans les fluides extracellulaires. Le mode de sécrétion des annexines n'est pour l'instant pas clairement identifié : l'intervention d'un transporteur ABC (ATP Binding Cassette) a été proposée pour l'externalisation de l'annexine A1 (Chapman et al., 2003). Concernant l'annexine A2, plusieurs hypothèses ont été émises : une étude montre que la phosphorylation de l'annexine A2 sur le résidu tyrosine 23 forcerait son insertion dans la membrane puis son relargage vers l'extérieur de la cellule (Danielsen et al., 2003; Deora et al., 2004); l'annexine A2 pourrait aussi, en formant des pores qui déstabiliseraient la membrane, provoquer sa propre libération en même temps que celle de fragments membranaires (Faure et al., 2002).

#### 4) Les différentes fonctions des annexines

Le fait que la séquence protéique et la structure tridimensionnelle du « cœur » des annexines soient particulièrement bien conservées au cours de l'évolution révèle leur importance physiologique. De plus, les annexines sont capables d'interagir avec des protéines très diverses : des phospholipases, des kinases, des GTPases ainsi que leurs protéines activatrices (GAP),... (Pour revue voir (Gerke and Moss, 1997; Gerke and Moss, 2002)). Ceci souligne que les annexines se trouvent au carrefour de beaucoup de voies de signalisation dans lesquelles elles peuvent donc intervenir. Comme les annexines lient les phospholipides, elle ont aussi la capacité à interagir avec les feuilletts cytoplasmiques de membranes cellulaires contenant ces phospholipides. De ce fait, les annexines ont été impliquées dans de nombreux phénomènes liés aux membranes, notamment dans le trafic membranaire, incluant la polarité cellulaire, l'exocytose, l'endocytose, et la phagocytose (Gerke et al., 2005; Lecat and Lafont, 1999; Rescher and Gerke, 2004). Des fonctions de canaux ioniques ou de régulateurs de canaux ioniques leur ont également été attribuées, ainsi que des activités extracellulaires telles que la régulation de l'inflammation ou de la coagulation sanguine (Gerke et al., 2005; Gerke and Moss, 2002). Dans ce paragraphe, nous aborderons les différents rôles des annexines, en insistant plus particulièrement sur le trafic membranaire.

##### *a) Les annexines dans le trafic membranaire intracellulaire*

La mise en place de la polarité des cellules est un exemple intéressant de trafic membranaire, incluant la biogenèse et le transport de vésicules depuis l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique ainsi que leur exocytose constitutive ciblée vers l'un des pôles de la cellule (Schuck and Simons, 2004). L'annexine A13b, exprimée par les cellules épithéliales du rein et de l'intestin, est impliquée dans le transport vésiculaire polarisé depuis le compartiment trans-Golgi jusqu'à la membrane plasmique apicale. En effet, l'addition d'annexine A13b myristoylée augmente spécifiquement le transport apical, sans affecter le transport basolatéral (Lafont et al., 1998), alors qu'un anticorps dirigé contre cette protéine inhibe ce phénomène (Fiedler et al., 1995). De plus l'annexine A13b, présente dans les microdomaines lipidiques regroupant spécifiquement les protéines apicales dans le compartiment trans-Golgi (Lafont et al., 1998), participe non seulement à l'adressage des vésicules qui en sont issues, mais également à leur bourgeonnement (Lecat and Lafont, 1999).

Plusieurs annexines seraient impliquées dans un second évènement de trafic membranaire : l'exocytose. Par exemple, l'annexine A7 est capable d'agréger des granules

chromaffines (Creutz et al., 1978), et pourrait promouvoir leur fusion avec la membrane plasmique en présence de calcium et de GTP (Caohuy and Pollard, 2002; Caohuy et al., 1996). L'annexine A7 interviendrait également dans la fusion des corps lamellaires avec la membrane plasmique dans les cellules alvéolaires de type II (Chander et al., 2003). L'implication de l'annexine A2 dans l'exocytose fera l'objet d'un paragraphe à part (paragraphe II 2 de ce chapitre).

L'endocytose est un processus au cours duquel il y a une internalisation de membrane plasmique pour permettre le recyclage ou la dégradation des éléments qui la compose. Les vésicules d'endocytose sont dans un premier temps apportées vers un compartiment cellulaire appelé « endosome précoce ». S'ensuivent plusieurs phases de tri : l'une aboutit au transport de molécules vers les endosomes de recyclage ; l'autre implique le détachement des endosomes tardifs multivésiculaires depuis les endosomes primaires, permettant de trier les molécules destinées à la dégradation (Gerke et al., 2005; Gruenberg and Stenmark, 2004). Les membranes du système endosomal ont été identifiées comme des structures-cibles de certaines annexines (Gerke et al., 2005; Gerke and Moss, 1997; Gerke and Moss, 2002; Lecat and Lafont, 1999). L'annexine A1 a été impliquée dans la formation des vésicules internes des endosomes multivésiculaires, qui permettent la séparation des récepteurs membranaires destinés à la dégradation, des récepteurs recyclés qui retournent à la membrane. La phosphorylation de l'annexine A1 par le récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor) internalisé dans les corps multivésiculaires, pourrait être un signal de ségrégation du récepteur dans ces structures (Futter et al., 1993; Gerke et al., 2005). Seconde annexine à avoir été impliquée dans les phénomènes d'endocytose : l'annexine A6 qui participerait à l'endocytose de vésicules à clathrine (Gerke et al., 2005; Kamal et al., 1998; Lecat and Lafont, 1999). En effet, elle permettrait le clivage de la spectrine par des protéases à cystéine, ce qui favoriserait le détachement des vésicules à clathrine de la spectrine associée à la membrane (Kamal et al., 1998).

Un quatrième mode de trafic membranaire est la phagocytose, qui permet à une cellule d'ingérer des particules ou pathogènes de grande taille. Ce processus nécessite : 1) un apport de membranes intracellulaires par exocytose autour de la particule ; 2) l'intervention du cytosquelette d'actine pour permettre l'extension des filopodes ; et finalement 3) la fusion du phagosome avec des endosomes et des lysosomes appartenant à la voie de dégradation (Niedergang and Chavrier, 2004; Pittis et al., 2003). L'annexine A2 est susceptible d'agir à ces trois niveaux du processus phagocytotique puisqu'elle est présente au niveau du phagosome en formation (Pittis et al., 2003) et tout au long de la voie endosomale. Plusieurs

autres annexines sont associées au phagosome soit pendant sa formation soit lors des étapes plus tardives où il fusionne avec les endosomes ou les lysosomes (Diakonova et al., 1997; Kusumawati et al., 2000; Kusumawati et al., 2001; Pittis et al., 2003). Il a été montré récemment que des macrophages de souris transgéniques, n'exprimant plus l'annexine A1, présentent une réduction de leurs capacités phagocytaires (Yona et al., 2006).

#### *b) La formation et la régulation de canaux ioniques par les annexines*

La capacité des annexines à former des canaux ioniques a été suggérée par le fait que, lorsqu'elles sont insérées dans des membranes artificielles, elles présentent une sélectivité ionique, une dépendance du voltage et une conductance équivalentes à celles de canaux calciques (Berendes et al., 1993). La structure cristallisée de l'annexine A5 montre que les « répétitions annexines » du « cœur » sont disposées sur un plan et délimitent un pore central bordé de résidus chargés (Huber et al., 1992; Huber et al., 1990). Une telle structure pourrait correspondre à celle d'un canal avec une spécificité ionique déterminée par la nature des résidus chargés. Cependant, cette idée reste controversée, et les données sur des annexines fonctionnant comme canaux calciques *in vivo* sont rares (Gerke et al., 2005; Rescher and Gerke, 2004).

En revanche, la régulation de canaux ioniques par les annexines est moins controversée. L'annexine A6, appliquée de manière exogène sur des feuillettes de membrane de réticulum sarcoplasmique reconstitués *in vitro*, est capable d'augmenter spécifiquement la durée et la fréquence d'ouverture des canaux calciques sensibles à la ryanodine. Elle pourrait donc participer au couplage excitation-contraction dans les muscles striés squelettiques et cardiaque (Diaz-Munoz et al., 1990; Gerke and Moss, 2002). L'annexine A4, en interagissant avec un canal chlorure dans des cellules épithéliales, empêcherait son activation par la protéine kinase II dépendante de la calmoduline (Chan et al., 1994).

#### *c) Les fonctions extracellulaires des annexines*

Les rôles physiologiques des annexines dans l'espace extracellulaire semblent assez variés. L'annexine A1 présente une activité anti-inflammatoire, car elle est capable de désensibiliser des capteurs de peptides bactériens responsables de la migration des lymphocytes vers les sites d'infection bactérienne (Perretti and Gavins, 2003; Rescher and Gerke, 2004). L'annexine A5 a des propriétés anticoagulantes : sa liaison aux phospholipides anioniques, en particulier le PS, présents à la surface des cellules limiterait la liaison des facteurs de coagulation (Rand, 2000).

Dans les vaisseaux sanguins, l'annexine 2, sous forme tétramérique avec S100A10, joue un rôle important dans la fibrinolyse, processus qui permet la dégradation de la fibrine par une enzyme, la plasmine (Kim and Hajjar, 2002). A la surface des cellules, la protéine S100A10 lie le plasminogène et stimule son activation en plasmine par le tPA (tissue plasminogen activator) (Kassam et al., 1998). L'annexine A2 pourrait réguler cette activité en modifiant la quantité de S100A10 présente à l'extérieur des cellules mais également en agissant comme une réductase de la plasmine (Kwon et al., 2005). De plus, cet effet de la protéine S100A10, associée avec l'annexine A2, sur la production de plasmine serait impliqué dans divers processus, tels que la régulation de la circulation artérielle ou le développement de certaines pathologies neuropsychiatriques (Gerke et al., 2005; Kim and Hajjar, 2002; Rescher and Gerke, 2004; Tsai, 2007).

## II) L'annexine A2 et l'exocytose.

L'annexine A2, protéine de 36 kilodaltons, possède les caractéristiques communes à toutes les annexines, mais également quelques spécificités. Dans ce chapitre, je mettrai en avant ce qui la distingue de ses proches cousines, et j'insisterai sur son rôle dans l'exocytose régulée.

### 1) Les particularités de l'annexine A2

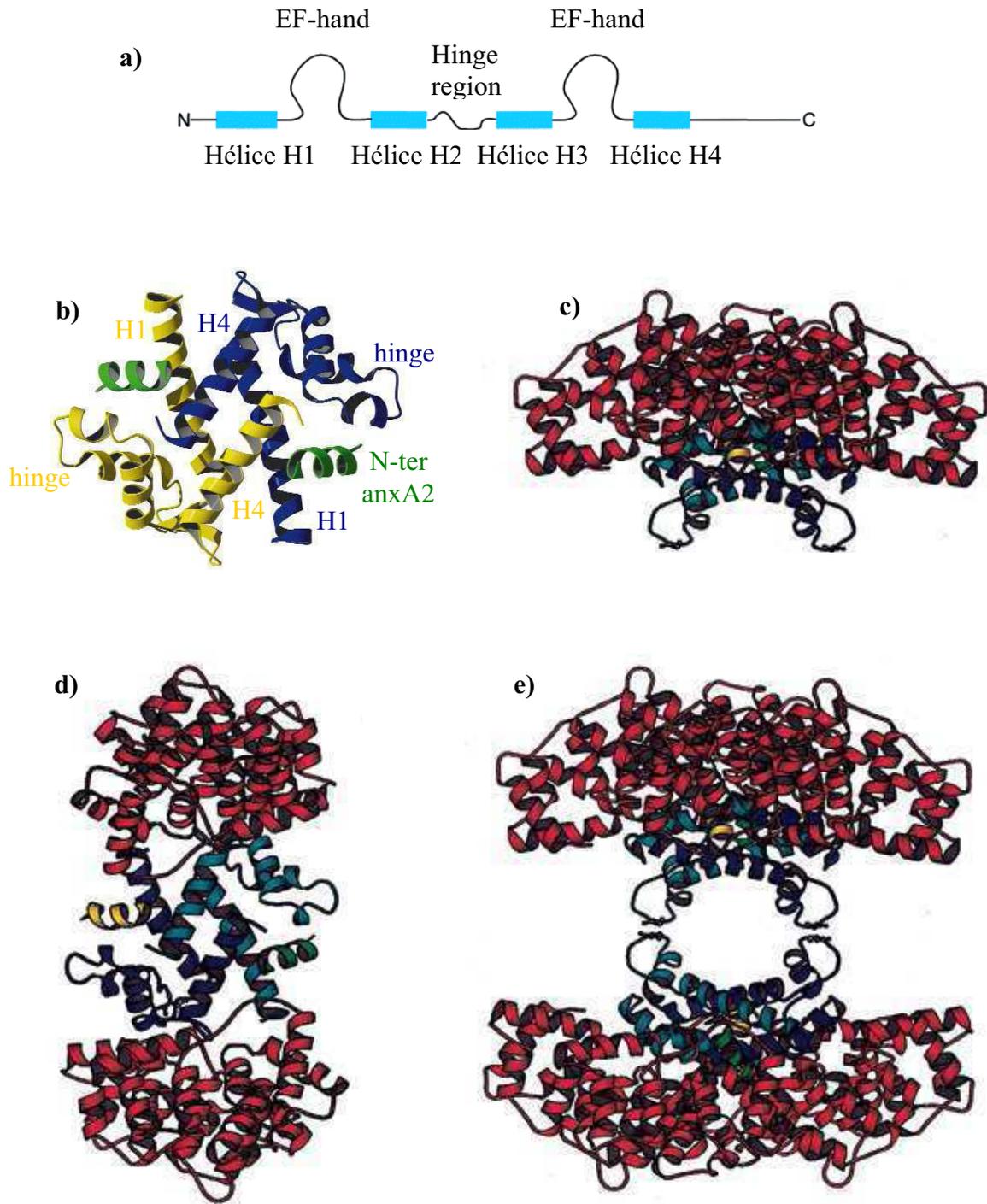
L'annexine A2 possède plusieurs particularités qui la distinguent des autres membres de la famille des annexines. Tout d'abord, elle interagit avec la protéine S100A10, avec laquelle elle peut former un hétérotétramère. Elle comporte également plusieurs sites de phosphorylation par la PKC et pp60<sup>src</sup>. Finalement l'annexine A2 est capable de se lier au phosphatidyl-inositol bisphosphate (PIP2) et à l'actine.

#### *a) La protéine S100A10 et la formation du tétramère*

L'annexine A2 interagit avec la protéine S100A10 pour former un hétérotétramère contenant deux molécules d'annexine A2 et deux molécules S100A10.

S100A10 a un poids moléculaire de 11 kD et appartient à la famille des protéines S100 qui ont la particularité de comporter deux domaines de liaison au calcium de type « EF-hand » (Gerke and Weber, 1985). Ces domaines sont constitués d'une boucle flanquée de deux hélices  $\alpha$  (figure 12a) et sont connectés entre eux par une région charnière ou « hinge region » (Donato, 2001; Rety et al., 1999). S100A10 est la seule protéine de cette famille à avoir perdu sa capacité de liaison au calcium à cause de mutations dans les domaines « EF-hand ». De ce fait, S100A10 est dans une conformation constitutivement active (Donato, 1999; Donato, 2001; Santamaria-Kisiel et al., 2006). Comme presque toutes les protéines S100, S100A10 existe sous la forme d'un homodimère (Donato, 1999; Rety et al., 1999) dans lequel deux molécules S100A10 sont assemblées de manière antiparallèle (figure 12b) par des liaisons non-covalentes entre la première hélice  $\alpha$  du premier motif « EF-hand » (hélice H1) et la seconde hélice  $\alpha$  de la seconde « EF-hand » (hélice H4) (Rety et al., 1999).

L'interaction de l'annexine A2 avec S100A10 nécessite la formation d'une hélice  $\alpha$  amphipathique par les 14 derniers acides aminés à l'extrémité N-terminale de l'annexine A2 et l'acétylation du résidu sérine 1 (Becker et al., 1990; Johnsson et al., 1988). L'annexine A2



**Figure 12 : Les structures de la protéine S100A10 et du tétramère d'annexine A2.**

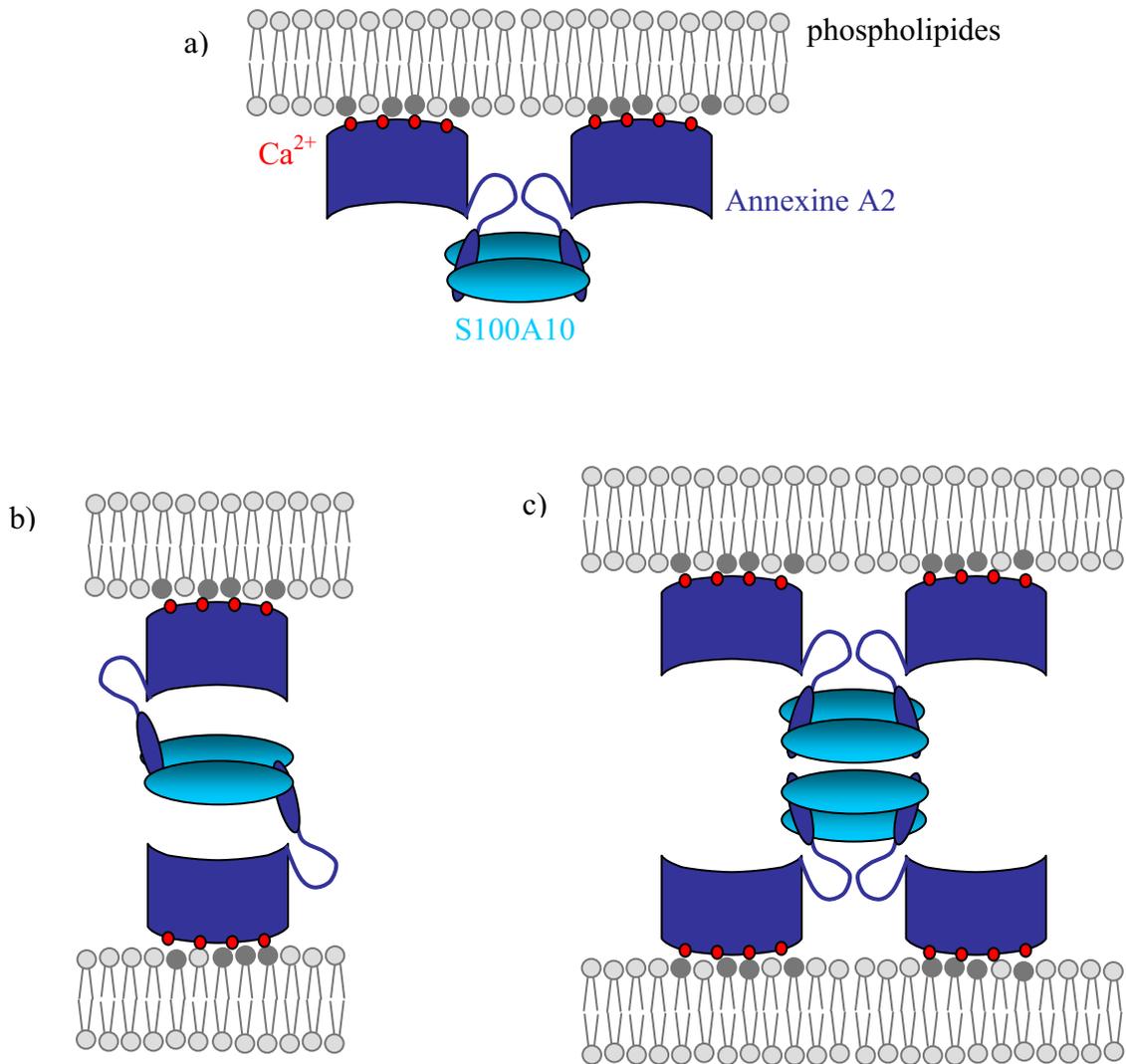
**a)** Structure secondaire de S100A10. **b)** Structure tridimensionnelle d'un dimère de S100A10 (bleu et jaune) dans lequel s'insèrent les parties N-terminales de deux molécules d'annexine A2 (N-ter anxA2).

**c, d, e)** Les sous-unités S100A10 sont représentées en bleu clair et bleu foncé, les sous-unités annexine A2, en rouge, avec les parties N-terminales en jaune et vert. **c)** Structure d'un hétérotétramère présentant les deux sous-unités annexine A2 sur une même face. **d)** Structure d'un hétérotétramère dont les sous-unités annexine A2 pointent dans des directions opposées. **e)** Structure d'un hétérooctamère composé de deux hétérotétramères.

ne peut se lier qu'avec le dimère de S100A10 (figure 12b) : l'hélice  $\alpha$  de l'annexine A2 s'insère dans une poche hydrophobe délimitée par l'hélice H1 et la région charnière de l'un des monomères de S100A10 et l'hélice H4 du second monomère de S100A10 (Rety et al., 1999; Sopkova-de Oliveira Santos et al., 2000). Quelques liaisons hydrogènes viennent compléter les interactions hydrophobes au sein de ce complexe (Rety et al., 1999). Chaque face du dimère pouvant interagir avec une molécule d'annexine A2, il y a formation d'un hétérotétramère comportant deux molécules d'annexine A2 reliées par le dimère de S100A10 (Gerke et al., 2005; Rety et al., 1999; Sopkova-de Oliveira Santos et al., 2000). Du point de vue de la structure tridimensionnelle, cet hétérotétramère peut adopter plusieurs conformations (figure 12c, d) : soit les deux molécules d'annexine A2 sont orientées sur la même face du tétramère, soit ces deux molécules pointent dans des directions opposées. La formation d'hétérooctamères (figure 12e) grâce à la formation d'un pont disulfure entre deux dimères de S100A10 a également été proposée (Menke et al., 2004; Sopkova-de Oliveira Santos et al., 2000).

La liaison de S100A10 modifie les propriétés de l'annexine A2, de ce fait le tétramère est souvent considéré comme la forme « active » de cette protéine. Grâce à sa structure, le tétramère permet à l'annexine A2 de jouer un rôle dans le pontage entre deux membranes ou de lier plusieurs lipides au sein d'une même membrane (figure 13) (Lambert et al., 1997; Menke et al., 2004; Sopkova-de Oliveira Santos et al., 2000). L'association de l'annexine A2 avec S100A10 augmente son affinité pour le calcium et pour les lipides (Donato, 1999; Evans and Nelsestuen, 1994; Gerke and Moss, 2002). De plus, les sites de phosphorylation de l'annexine A2 étant proches du site de liaison de S100A10, l'association du tétramère diminue la capacité des protéines kinases à phosphoryler l'annexine A2, sans doute pour des raisons d'encombrement stérique (Johnsson et al., 1986).

Depuis quelques années, la protéine S100A10 a pris de plus en plus d'importance au niveau fonctionnel : elle régulerait l'activité et la localisation d'un certain nombre de canaux ioniques ou de récepteurs avec lesquels elle peut interagir. Parmi ceux-ci, on trouve plusieurs types de canaux sodiques ( $\text{Na}_v1.8$ ), potassiques (TASK1 : two-pore acid-sensitive  $\text{K}^+$  channel 1), ou calciques (TRPV5 et TRPV6 : transient receptor potential V5 et V6) (Gerke et al., 2005; Gerke and Moss, 2002), ainsi que plusieurs récepteurs dont le récepteur  $5\text{HT}_{1B}$  (Svenningsson et al., 2006).



**Figure 13 : Les modes d'interaction de l'annexine A2 avec les membranes.**

L'annexine A2 sous forme hétérotétramérique peut faire des pontages **a)** entre des phospholipides au sein d'une même membrane ou **b)** entre deux membranes différentes. **c)** L'hétérooctamère peut également intervenir dans le pontage de deux membranes différentes. D'après (Rescher et al., 2004)

*b) Les phosphorylations de l'annexine A2 par la PKC et pp60<sup>src</sup>.*

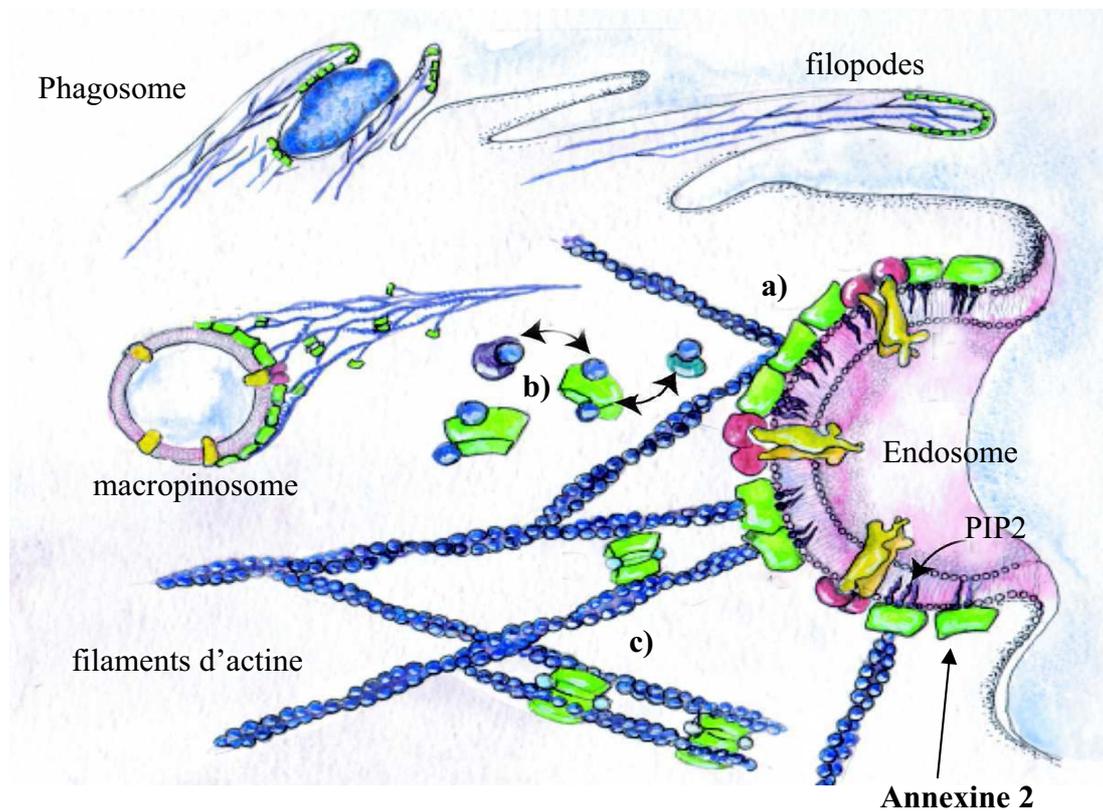
La partie N-terminale de l'annexine A2 est le siège de modifications post-traductionnelles relativement importantes : la protéine kinase C peut phosphoryler les résidus sérine 11, 17, 21 et 25, et la tyrosine 23 est la cible d'une phosphorylation par la tyrosine kinase pp60<sup>src</sup> (Gould et al., 1986; Johnsson et al., 1986; Regnouf et al., 1995; Waisman, 1995).

Dans les cellules chromaffines, la phosphorylation de la sérine 25 par la PKC est indispensable au rôle de l'annexine A2 au cours de l'exocytose (Delouche et al., 1997; Sarafian et al., 1991). De plus, l'annexine A2 phosphorylée sur la sérine 25 n'est plus capable d'agréger des vésicules lipidiques (Johnstone et al., 1992) mais elle présente des propriétés fusiogènes pour les granules qui sont déjà associés entre eux (Regnouf et al., 1995). L'annexine A2 est donc probablement phosphorylée sur la sérine 25 après sa translocation à la périphérie cellulaire. Un mécanisme similaire a été observé lors de la stimulation des lymphocytes T (Dubois et al., 1995).

La phosphorylation de la tyrosine 23 par la kinase pp60<sup>src</sup> inhibe à la fois la liaison de l'annexine A2 aux phospholipides, l'agrégation de granules chromaffines par le tétramère en présence de calcium, la liaison à l'actine et les propriétés de fasciculation de filaments d'actine (Gerke and Moss, 2002; Hubaishy et al., 1995; Powell and Glenney, 1987). Cette phosphorylation de la tyrosine 23 a été impliquée dans le processus d'endocytose (Biener et al., 1996), mais pourrait aussi constituer un signal d'importation de l'annexine A2 dans le noyau (Eberhard et al., 2001; Yan et al., 2007) ou permettre l'insertion de l'annexine A2 dans la membrane plasmique et son extrusion vers l'extérieur de la cellule (Deora et al., 2004).

*c) La liaison au phosphatidyl-inositol (4, 5) bisphosphate (PIP2)*

Comme toutes les annexines, l'annexine A2 a la capacité de se lier aux phospholipides chargés négativement, notamment à l'acide phosphatidique, à la phosphatidyl-sérine, ou au phosphatidyl-inositol, par ordre d'affinité décroissante (Gerke et al., 2005; Gerke and Moss, 1997; Raynal and Pollard, 1994). Par contre, elle présente la particularité de se lier au PIP2 avec une affinité relativement élevée, proche de celle du domaine « Pleckstrin Homology » (PH) de la phospholipase C- $\delta$ 1 (PLC $\delta$ 1), domaine de référence pour la liaison au PIP2. Des analyses par résonance plasmonique de surface ont montré que l'annexine A2 liait le PIP2 avec une affinité importante et qu'elle était également capable de lier d'autres phosphoinositides avec une affinité quatre fois moindre, indiquant que la spécificité de l'annexine A2 pour le PIP2 au sein des cellules serait due en partie à l'abondance du PIP2 par rapport aux autres phosphoinositides (Gokhale et al., 2005). Le site de liaison du PIP2 sur la



**Figure 14 : Les modes d'interaction de l'annexine A2 avec le cytosquelette d'actine.** L'annexine A2 est généralement associée à des structures dynamiques d'actine. Elle peut **a)** lier les filaments d'actine à une membrane, **b)** interagir avec des monomères d'actine, ou **c)** fasciculer des filaments d'actine entre eux. D'après un dessin original de Matt Hayes (Hayes et al., 2004b).

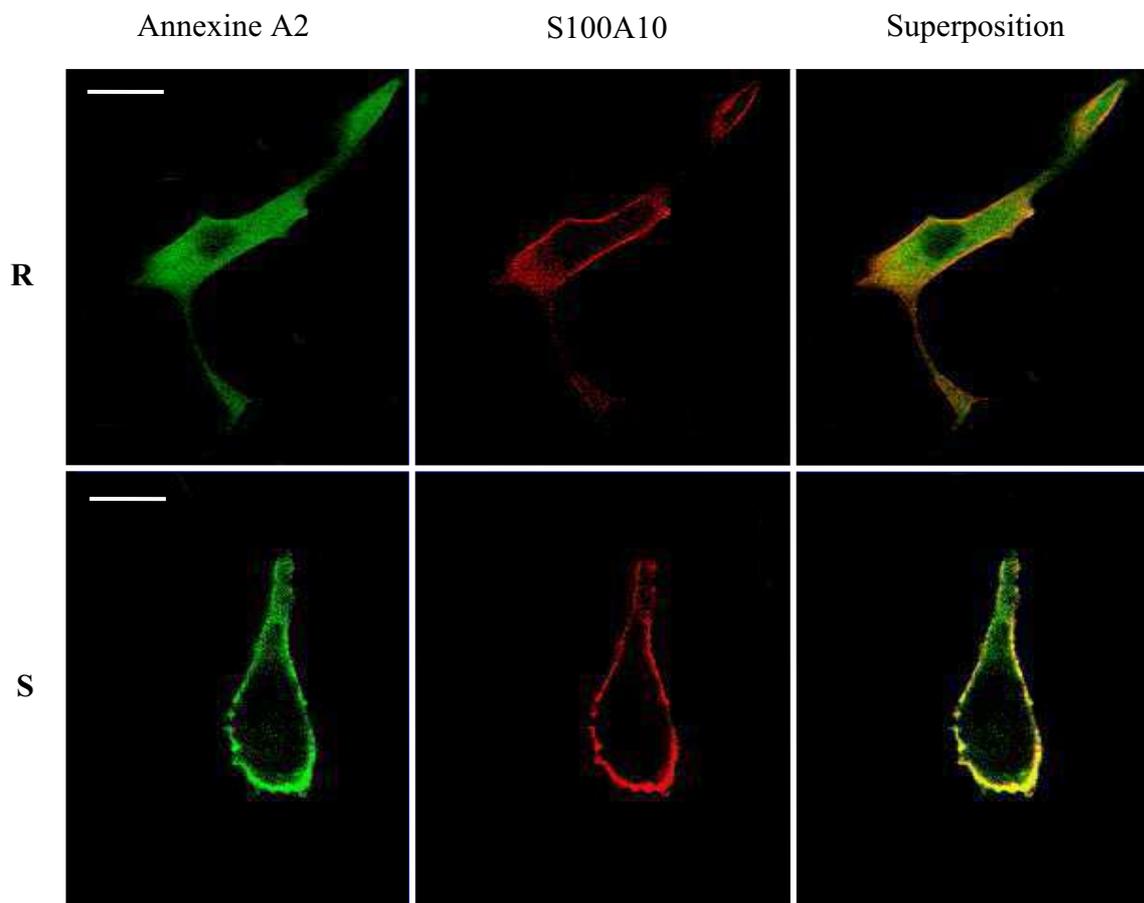
molécule d'annexine A2 est composé de résidus cationiques de surface, la lysine 279 et la lysine 281, dont la mutation réduit d'environ 20 fois l'affinité de l'annexine A2 tétramérique pour les membranes contenant du PIP2 (Gokhale et al., 2005).

L'annexine A2 étant capable de s'oligomériser (Ross et al., 2003), elle peut, en liant plusieurs molécules de PIP2, les ségréguer et constituer des domaines de signalisation (Gokhale et al., 2005; Menke et al., 2005).

#### *d) La liaison à l'actine*

L'annexine A2 est capable d'interagir avec l'actine sous forme monomérique et filamenteuse (figure 14). Grâce à ces interactions, l'annexine A2 a été impliquée dans la polymérisation de l'actine : en effet elle permettrait l'apport de monomères d'actine et agirait comme une protéine de coiffe des filaments synthétisés (Hayes et al., 2006). Le site de liaison à l'actine a été identifié à l'extrémité C-terminale de la protéine : en effet, la délétion des 9 derniers acides aminés de l'annexine A2 suffit à inhiber sa liaison à l'actine (Filipenko and Waisman, 2001). Sous forme tétramérique, l'annexine A2 est aussi capable de fasciculer des filaments d'actine en présence de calcium (Glenney et al., 1987; Ikebuchi and Waisman, 1990) et peut donc affecter également la structure du cytosquelette d'actine (Hayes et al., 2004b). Le site responsable de cette activité a été découvert dans la quatrième répétition annexine du « cœur » : un peptide synthétique, correspondant aux acides aminés 286 à 294 de l'annexine A2, inhibe par compétition spécifiquement la fasciculation de l'actine par l'annexine A2 mais pas la liaison de l'actine en elle-même (Jones et al., 1992).

L'annexine A2 est généralement associée à des structures dynamiques d'actine (figure 14) qui interviennent dans un grand nombre de processus cellulaires comme l'adhésion et la migration cellulaires, la cytokinèse, ou le trafic membranaire incluant endocytose, exocytose, pinocytose et phagocytose (Hayes et al., 2004b). La capacité du tétramère à lier à la fois l'actine et des lipides permet à l'annexine A2 de former des complexes entre une membrane et le cytosquelette d'actine (Hayes et al., 2004b). Par exemple, l'annexine A2 est présente à la base des comètes d'actine des vésicules de macropinocytose (Merrifield et al., 2001), ou à la jonction entre la membrane plasmique et le cytosquelette d'actine aux sites d'attachement de bactéries sur la cellule hôte (Zobiack et al., 2002). Dans des cellules musculaires, l'annexine A2, en conjonction avec l'annexine A6, forme des complexes entre la membrane plasmique et les filaments d'actine de manière dépendante du calcium, ce qui permettrait un couplage entre la réorganisation de la membrane et celle du cytosquelette pour que le cycle de



**Figure 15 : La translocation de l'annexine A2 dans les cellules chromaffines stimulées.**

Les cellules ont été maintenues au repos (R) ou stimulées (S) pendant 10 minutes à 37°C avec une solution de nicotine 20  $\mu$ M. Après fixation, un double marquage avec des anticorps anti-annexine A2 et anti-S100A10 a été réalisé. Les images ont été acquises au microscope confocal dans la même section optique. Barres : 5  $\mu$ m.

Dans les cellules au repos, l'annexine A2 est cytoplasmique et S100A10 est localisée à la membrane plasmique. Sous l'effet de la stimulation, l'annexine A2 est transloquée à la membrane plasmique où elle colocalise avec S100A10. (Chasserot-Golaz et al., 1996).

contraction/relaxation de la fibre musculaire soit efficace (Babiychuk and Draeger, 2000; Babiychuk et al., 1999).

## **2) L'annexine A2 dans le trafic membranaire**

### *a) Annexine A2 et exocytose*

L'annexine A2 a été particulièrement impliquée dans l'exocytose des granules de sécrétion régulée par le calcium (Ali et al., 1989; Chasserot-Golaz et al., 1996; Sagot et al., 1997; Sarafian et al., 1991). Son rôle dans ce processus a été suggéré en étudiant la sécrétion de catécholamines par des cellules chromaffines dont la membrane plasmique a été perméabilisée par la streptolysine O. Dans ces cellules, la capacité sécrétrice est progressivement perdue à cause de la fuite de protéines cytosoliques indispensables à l'exocytose vers le milieu extracellulaire. La réintroduction de ces protéines cytosoliques dans le cytoplasme des cellules constitue un moyen de tester leur implication dans le processus exocytotique (Sarafian et al., 1987). Ainsi la réintroduction de l'annexine A2 permet de restaurer en partie l'exocytose, démontrant son importance pour ce phénomène (Ali et al., 1989; Sarafian et al., 1991). Le tétramère est plus efficace que le monomère et la phosphorylation par la PKC est indispensable à cette restauration (Sarafian et al., 1991). De plus, l'annexine A2 est capable d'agréger les granules de sécrétion entre eux en présence de calcium et même d'induire leur fusion (Drust and Creutz, 1988). De plus l'annexine A2 est retrouvée à la jonction entre les granules et la membrane plasmique dans des cellules neurosécrétrices stimulées (Nakata et al., 1990; Senda et al., 1994).

Dans les cellules chromaffines au repos, l'annexine A2 est essentiellement cytosolique et son partenaire S100A10 est localisé dans la région subplasmalemmale. La stimulation de l'exocytose par la nicotine provoque une translocation de l'annexine A2 à la périphérie des cellules (figure 15). Des expériences de fractionnement subcellulaire ont montré que la translocation de l'annexine A2 vers la périphérie cellulaire induit son association à une fraction insoluble au Triton-X100 (Chasserot-Golaz et al., 1996; Sagot et al., 1997). La micro-injection d'un peptide correspondant aux acides aminés 15 à 26 de l'annexine A2, qui bloque la translocation de l'annexine A2 endogène, est capable d'inhiber la sécrétion de catécholamines mesurée par ampérométrie. La présence de S100A10 dans les cellules chromaffines adrénérgiques diminue de 10 fois la concentration calcique nécessaire à la translocation de l'annexine A2 et à l'exocytose. Ainsi la translocation de l'annexine A2 vers

la membrane plasmique, et probablement la formation du tétramère dans la zone subplasmalemmale, semble une étape essentielle dans le processus d'exocytose (Chasserot-Golaz et al., 1996). Les cellules chromaffines noradrénergiques, ainsi que la lignée PC12 qui en dérive, n'expriment pas S100A10, ce qui suggère que l'implication de l'annexine A2 dans l'exocytose ne requerrait pas forcément la formation du tétramère annexine A2-S100A10 (Chasserot-Golaz et al., 1996). De plus, l'implication de l'annexine A2 dans l'exocytose restait à ce stade encore très controversée, puisque l'expression stable d'une chimère de l'annexine A2 et de S100A10, formant des agrégats d'annexine A2 dans le cytoplasme et empêchant la translocation de l'annexine A2 endogène, n'affectait pas l'exocytose dans les cellules PC12 (Graham et al., 1997). Une démonstration directe de l'implication de l'annexine A2 au cours de la sécrétion dans les cellules chromaffines restait à faire.

Toutefois, un rôle de l'annexine A2 dans l'exocytose a également été mis en évidence dans d'autres modèles cellulaires. Dans les cellules endothéliales, un peptide synthétique, correspondant aux 14 résidus de l'annexine A2 formant le site de liaison à S100A10, inhibe la formation du tétramère et diminue la fusion des corps de Weibel-Palade avec la membrane plasmique (Konig et al., 1998). Il a aussi été montré que l'annexine A2 est sélectivement impliquée dans le mécanisme d'exocytose des facteurs coagulants comme le facteur de von Willebrand contenus dans les corps de Weibel-Palade (Knop et al., 2004). L'annexine A2 participe à la sécrétion du surfactant par les cellules alvéolaires de type II dans les alvéoles pulmonaires (Chattopadhyay et al., 2003; Chintagari et al., 2006; Liu, 1999; Singh et al., 2004). En effet, l'introduction d'annexine A2 tétramérique est capable de provoquer la fusion de corps lamellaires isolés, contenant le surfactant, avec des fragments de membrane plasmique de cellules alvéolaires (Chattopadhyay et al., 2003), alors que l'inhibition de l'expression de l'annexine A2 dans les cellules alvéolaires réduit l'exocytose (Chintagari et al., 2006). De manière intéressante, le rôle de l'annexine A2 dans la sécrétion du surfactant par les cellules alvéolaires de type II est associé à la réorganisation du cytosquelette d'actine (Singh et al., 2004) et à la formation de microdomaines lipidiques qui constitueraient des sites d'exocytose (Chintagari et al., 2006). Ainsi l'annexine semble avoir une grande importance physiologique au cours du processus de sécrétion dans des types cellulaires variés.

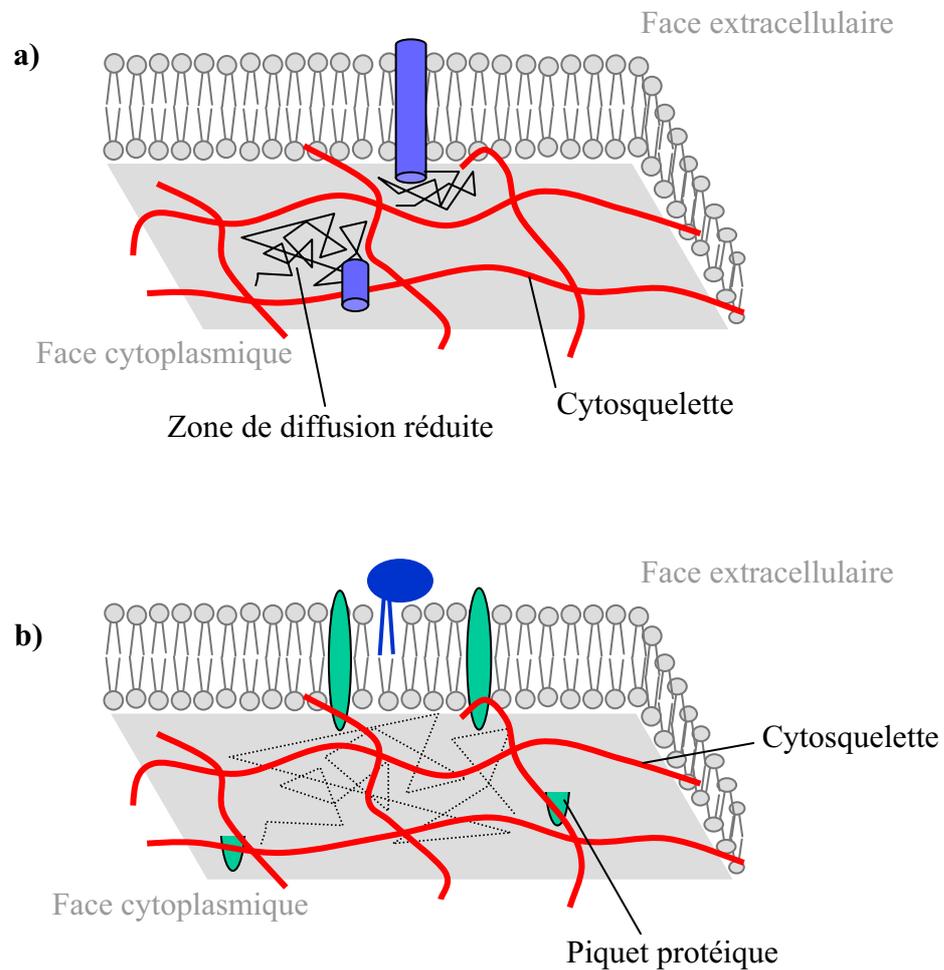
#### *b) Annexine A2 et endocytose*

L'annexine A2 a été impliquée dans différentes phases de la biogénèse et du trafic des membranes endosomales. Par exemple, elle participe à un complexe multimoléculaire facilitant l'internalisation des cholestéryl-esters à partir des caveolae (Gerke et al., 2005;

Uittenbogaard et al., 2002). Le tétramère d'annexine A2 a également été engagé dans la régulation de la morphologie des endosomes de recyclage périnucléaires (Zobiack et al., 2003), ainsi que dans le détachement des corps multivésiculaires depuis les endosomes précoces (Gruenberg and Stenmark, 2004; Mayran et al., 2003) Dans ce contexte, la formation par l'annexine A2 de domaines membranaires enrichis en cholestérol, permettrait de réguler à la fois la biogénèse et la morphologie de certains compartiments des endosomes (Gerke et al., 2005) et serait à la base de la régulation des voies de dégradation (Mayran et al., 2003).

### **3) Conclusion**

La membrane plasmique constitue un partenaire important de l'annexine A2. En vertu de ses capacités de liaison à certains lipides, l'annexine A2 a été décrite comme une protéine capable d'organiser les membranes en promouvant la formation de microdomaines lipidiques de manière dépendante du calcium (Babiyshuk and Draeger, 2000; Babiyshuk et al., 2002; Bandorowicz-Pikula, 2000; Mayran et al., 2003). Cette idée nous a semblé particulièrement intéressante dans le cadre du rôle de l'annexine A2 dans l'exocytose. C'est pourquoi nous avons envisagé la formation ou la stabilisation de microdomaines lipidiques par l'annexine A2 au cours de ce processus. Avant de passer aux résultats concernant ces recherches, je ferai quelques rappels sur l'organisation des membranes biologiques, en particulier sur l'organisation latérale en microdomaines lipidiques et sur l'intérêt de ces derniers du point de vue physiologique.



**Figure 16 : Les modes d'organisation des membranes biologiques, modèles de l'enclos de cytosquelette et des obstacles protéiques.**

**a)** la diffusion d'une protéine transmembranaire peut être restreinte par un réseau de cytosquelette apposé sous la membrane, qui bloque le passage de son domaine intracellulaire.

**b)** dans le cas de protéines ou de lipides présents uniquement dans le feuillet extracellulaire, la diffusion peut être limitée par des piquets protéiques reliés au cytosquelette, contre lesquels les molécules viennent buter.

## **C. Membranes biologiques et microdomaines lipidiques**

### **I) Un peu d'histoire sur les membranes biologiques...**

Les membranes biologiques sont des structures lipidiques qui d'une part constituent une barrière physique entre les milieux intra- et extracellulaire, et d'autre part délimitent des organites à l'intérieur des cellules. Le modèle de Singer et Nicolson, au début des années 70, décrivait ces membranes comme des mosaïques fluides avec une bicouche lipidique constituant un solvant neutre bidimensionnel, dans lequel des protéines peuvent diffuser librement et assurer leurs fonctions (Singer and Nicolson, 1972). Ce concept connaît une évolution presque constante depuis lors.

Une première modification a été apportée par le fait que la diffusion des protéines au sein des membranes n'est pas totalement aléatoire, mais peut être confinée transitoirement dans des domaines restreints, comme cela a été montré par exemple pour certaines molécules d'adhésion ou les récepteurs de certains facteurs de croissance (Jacobson et al., 1995). Dans un premier temps, ces restrictions de diffusion ont été principalement expliquées par l'existence d'un réseau de cytosquelette apposé sous la membrane, qui restreindrait la diffusion latérale en jouant le rôle d'enclos (Jacobson et al., 1995; Kusumi et al., 1993). Par la suite, la restriction de diffusion latérale a été démontrée aussi pour des protéines ancrées à la membrane par un motif GPI (glycosyl-phosphatidyl-inositol) ne pouvant pas être piégé par le cytosquelette cortical ; ceci a donc amené la notion d'interactions protéines-protéines servant d'obstacle à la diffusion aléatoire (figure 16) (Jacobson et al., 1995; Simson et al., 1995).

Que ce soit dans le modèle de l'enclos de cytosquelette ou celui des obstacles protéiques, la bicouche lipidique restait toujours considérée comme un simple solvant pour les protéines, et peu d'attention était portée à un rôle actif des lipides dans l'organisation des membranes. Cet aspect a été de plus en plus pris en considération grâce aux observations suivantes : Premièrement, les lipides sont distribués de manière asymétrique dans les deux feuillets de la bicouche lipidique, ce qui traduit un premier type d'organisation transversal des membranes. Dans les membranes plasmiques, la sphingomyéline les glycosphingolipides et la phosphatidyl-choline sont présents essentiellement dans le feuillet exoplasmique, alors que la

phosphatidyl-sérine est exclusivement dans le feuillet cytoplasmique et que la phosphatidyl-éthanolamine et le cholestérol sont présents dans les deux feuillets (van Meer, 1989). Deuxièmement, l'adressage des lipides nouvellement synthétisés est hautement régulé et ne se fait pas au hasard : dans les cellules polarisées comme les cellules épithéliales, les glycosphingolipides sont enrichis dans la membrane apicale par rapport à la membrane basolatérale (van Meer, 1989). Pour expliquer cette particularité, la formation de agrégats de glycosphingolipides servant de plate-forme d'adressage pour des protéines destinées à une localisation dans la membrane apicale a été proposée. Ceci sous-entendait une autre organisation des lipides, latérale cette fois, et c'est ainsi qu'est née la notion de microdomaines lipidiques (ou rafts lipidiques) (Simons and Ikonen, 1997; Simons and Toomre, 2000; Vereb et al., 2003).

## II) Les microdomaines lipidiques : définition et terminologie

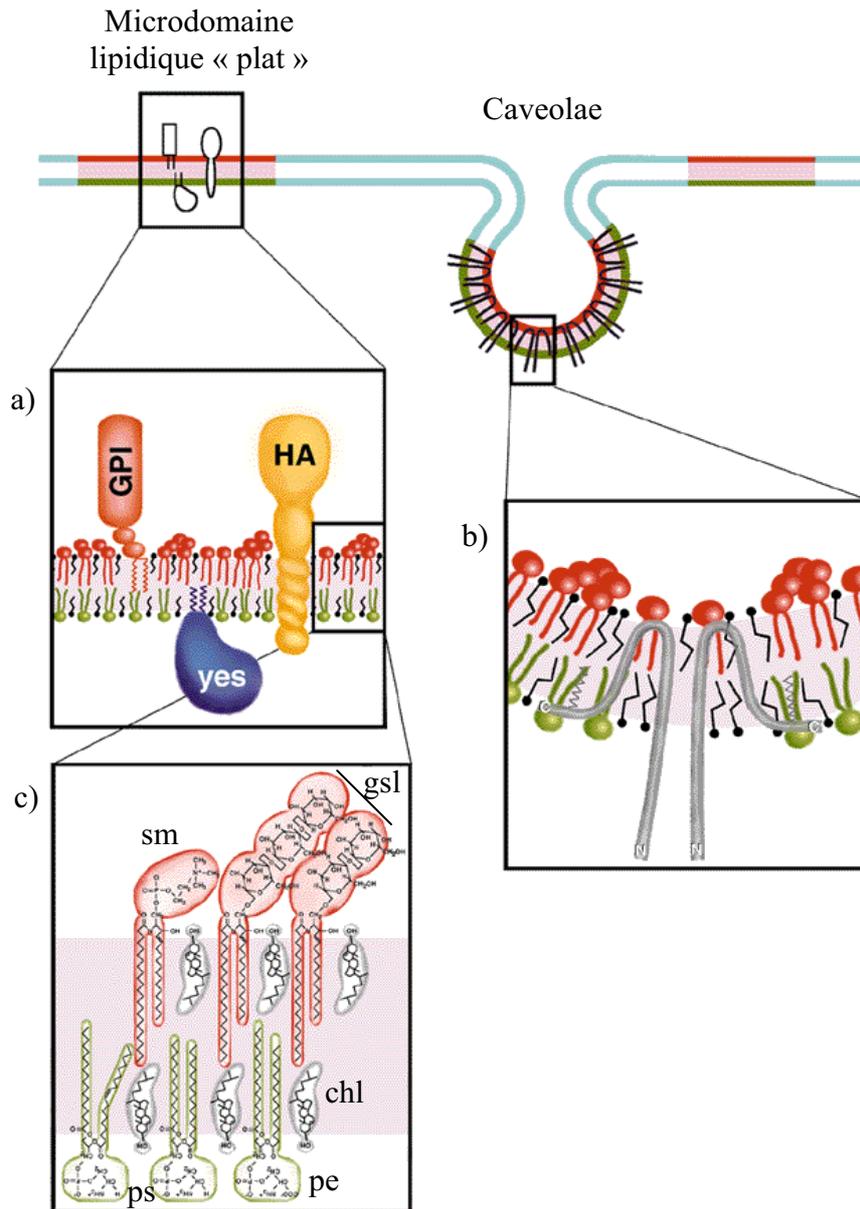
Pendant longtemps, la notion de rafts membranaires a été très fluctuante, et une communauté scientifique composée aussi bien de physiciens, de biochimistes que de biologistes cellulaires s'est penchée sur leur définition précise lors d'un symposium Keystone sur les microdomaines lipidiques et leurs fonctions cellulaires en 2006. La définition adoptée est la suivante : « les rafts membranaires sont des petits domaines (10-200 nm), hétérogènes, hautement dynamiques, enrichis en stérols et en sphingolipides, qui compartimentent les processus cellulaires. Ces petits rafts peuvent s'agréger pour former des plate-formes plus larges grâce à des interactions protéine-protéine et protéine-lipide. » (Pike, 2006). Cette définition a été soumise à bien des discussions, dans la mesure où leur visualisation est difficile, leur composition est variable, et les techniques mises en œuvre pour détecter leur existence ont des limites non négligeables (Munro, 2003; Pike, 2006).

### 1) Les caractéristiques des microdomaines lipidiques

La composition des microdomaines membranaires est très difficile à déterminer en raison de leur variabilité à la fois dans l'espace et dans le temps. Il semble de plus en plus évident que les radeaux lipidiques forment une population hétérogène, avec presque autant de sous-types qu'il existe de fonctions ou de types cellulaires. Toutefois, un certain nombre de caractéristiques quant à la présence de lipides particuliers ou au recrutement préférentiel de certaines protéines a pu être mis en évidence (figure 17). Dans un premier temps, je décrirai donc les principaux marqueurs lipidiques et protéiques utilisés classiquement pour étudier ces radeaux. Puis, j'exposerai la structure des microdomaines lipidiques ainsi que leurs propriétés physiques. Enfin j'aborderai la notion de variabilité au sein des microdomaines lipidiques en décrivant un sous-type particulier, les caveolae.

#### *a) Les marqueurs lipidiques*

L'une des caractéristiques principales des nano- et microdomaines lipidiques est leur enrichissement en cholestérol et en sphingolipides, au détriment des glycérophospholipides. Cette propriété est considérée comme la seule réellement partagée par tous les types de



**Figure 17 : La composition et la structure des radeaux lipidiques.**

Les microdomaines lipidiques sont des plate-formes de composition et d'organisation différentes ségréguées dans la bicouche lipidique. **a)** Les microdomaines lipidiques peuvent regrouper certains constituants protéiques tels que les protéines à ancre GPI, certaines protéines transmembranaires (ici l'hémagglutinine du virus de l'influenza), ou des protéines portant des myristoylations ou des palmitoylations (comme la protéine kinase Yes de la famille Src). En **b)** est représentée la caveoline, qui serait responsable de la forme caractéristique en flasque des caveolae. **c)** La bicouche des microdomaines lipidiques est assymétrique, avec le feuillet exoplasmique enrichi en sphingomyéline (sm) et en glycosphingolipides (gsl), et le feuillet interne enrichi en phosphatidyl-sérine (ps) en phosphatidyl-éthanolamine (pe) et en phosphoinositides (non représentés). Le cholestérol (chl) s'insère entre les acides gras des deux feuillets. D'après (Simons and Ikonen, 1997).

radeaux lipidiques (Pike, 2003; Pike, 2006). Les sphingolipides sont dérivés du céramide et comportent plusieurs types de molécules dont la sphingomyéline et les gangliosides (GM1, GM2, GM3, GD3) (Hoekstra et al., 2003). Il semble que la nature de ces sphingolipides soit également variable d'un type de microdomaine à l'autre : ainsi, dans les lymphocytes-T en migration, la polarisation entre le front de migration, qui doit se faufiler et s'attacher à l'environnement, et l'uropode, qui doit au contraire se détacher pour pouvoir suivre le mouvement initié par le front de migration, nécessiterait la formation de microdomaines enrichis en GM3 et en GM1 respectivement (Gomez-Mouton et al., 2001). Les sphingolipides sont présents principalement dans le feuillet externe de la membrane. Dans le feuillet interne, on retrouve la phosphatidyl-éthanolamine et des phospholipides anioniques comme la phosphatidyl-sérine (figure 17) (Pike, 2003). Les phosphoinositides, et plus particulièrement le PIP2, ont également été décrits comme des constituants du feuillet interne de microdomaines lipidiques (Allen et al., 2007; Caroni, 2001; Gokhale et al., 2005; Hayes et al., 2004a; Parmryd et al., 2003; Rescher et al., 2004).

#### *b) Les marqueurs protéiques*

Les microdomaines lipidiques sont enrichis en une grande variété de protéines. On y trouve notamment des cavéolines, des flotillines, ou des protéines à ancrage glycosyl-phosphatidylinositol (GPI), qui constituent des marqueurs de ces radeaux (figure 17) (Pike, 2003).

La cavéoline est une protéine présente dans les *caveolae* (voir paragraphe *d*). Elle contient une région hydrophobe centrale qui serait responsable de son insertion dans la bicouche lipidique. Les cavéolines sont capables d'interagir avec le cholestérol et sont palmitoylées, mais ce dernier point n'est pas essentiel pour leur localisation dans les *caveolae*. En vertu de leur capacité à s'oligomériser, elles ont été impliquées dans la formation de ces structures, en constituant des sortes de réseaux permettant l'ancrage de constituants membranaires (Parton et al., 2006).

Les flotillines sont également considérées comme des marqueurs des radeaux lipidiques. Une étude récente montre que dans les lymphocytes T, ces protéines sont associées à des plate-formes préassemblées, un sous-type de microdomaines résistant à la solubilisation par la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine. Les autres marqueurs classiques de radeaux ne sont pas associés à ces plate-formes préassemblées au repos, mais s'y regroupent sous l'effet d'une stimulation. Il a donc été proposé pour les flotillines un rôle d'organisateur spatial du recrutement des nanodomaines en microdomaines (Rajendran et al., 2003).

Les ancrés GPI sont des signaux de ciblage des radeaux lipidiques bien connus. Parmi les protéines à ancrage GPI, on trouve par exemple Thy1 ou la protéine Prion (Brown, 2006). Là encore, la composition peut varier d'un microdomaine à l'autre, et ces deux protéines ne sont pas nécessairement associées dans les mêmes radeaux (Madore et al., 1999; Pike, 2003). Les paires de chaînes d'acide gras peu espacées constituent aussi un mode d'adressage dans les microdomaines lipidiques (Brown, 2006; Brown and Rose, 1992). Ainsi, les protéines myristoylées et palmitoylées, comme les kinases de la famille src ou certaines protéines G, ont une affinité pour les microdomaines relativement importante (Brown, 2006).

Bien sûr, toutes les protéines susceptibles d'interagir avec une protéine ou un lipide se trouvant dans les microdomaines peuvent se retrouver associées à eux de manière plus ou moins forte (Allen et al., 2007; Golub and Caroni, 2005).

### c) *La structure des microdomaines lipidiques et leurs propriétés physiques*

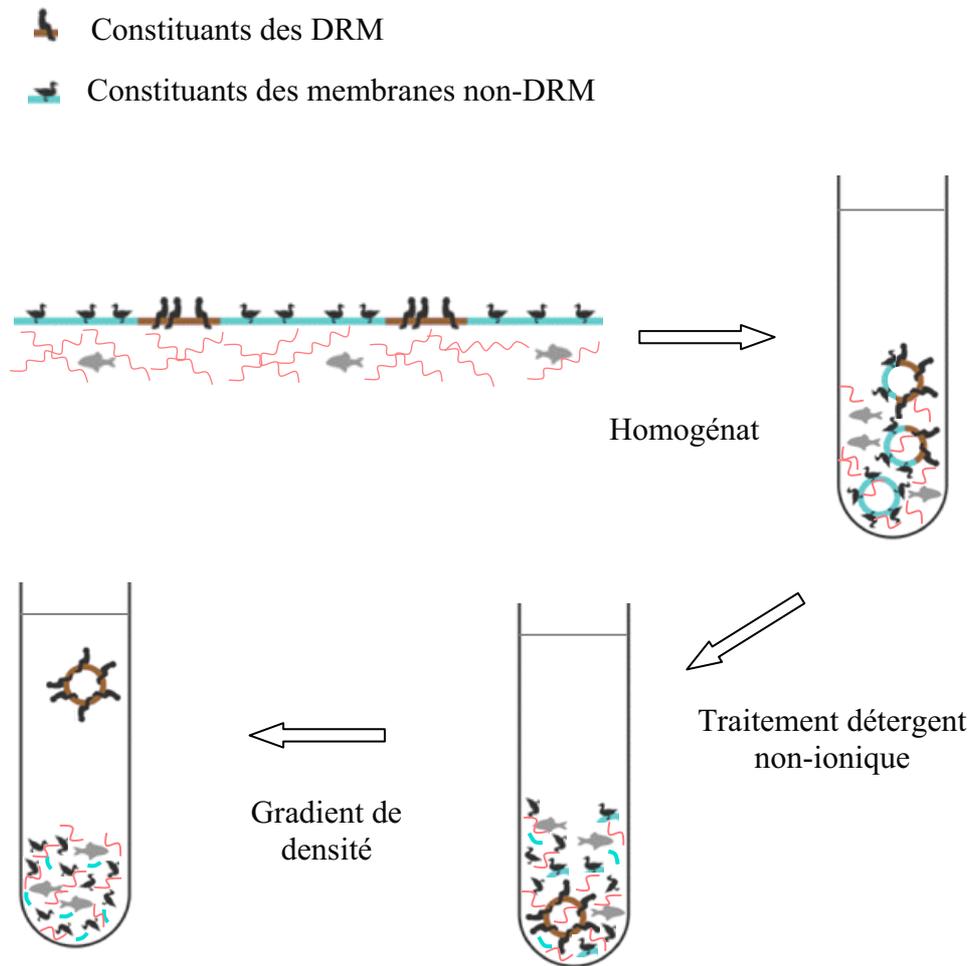
Pendant longtemps, les membranes lipidiques ont été considérées comme une phase fluide dans laquelle les lipides pouvaient circuler rapidement et se répartir de manière aléatoire (Singer and Nicolson, 1972). Toutefois, *in vitro*, la température de transition à laquelle un lipide peut passer d'une phase gélifiée à une phase fluide n'est pas identique pour tous les lipides, mais dépend de la longueur et de la saturation des chaînes d'acide gras. Ainsi à une température de 37°C, la plupart des glycérophospholipides sont dans une phase fluide (température de transition de l'ordre de 0°C), alors que des sphingomyélines comportant de longues chaînes d'acides gras (température de transition entre 40 et 80°C) sont dans une phase gélifiée (Schroeder et al., 1994). Comme nous l'avons déjà évoqué, les microdomaines lipidiques sont composés de nombreux sphingolipides et de phospholipides dont les chaînes d'acide gras sont souvent saturées (Pike, 2003), et ils seraient donc moins fluides que la membrane environnante. De plus ces lipides ont une tête polaire relativement imposante par rapport au volume occupé par leurs chaînes d'acide gras. Le cholestérol étant une petite molécule pouvant s'insérer dans les espaces vides entre les chaînes d'acides gras des deux feuillets (Simons and Ikonen, 1997), il a été proposé que l'insertion du cholestérol augmente le compactage des lipides et induise la transition des phases gélifiées et fluide en une troisième phase appelée phase fluide ordonnée. C'est cette phase fluide ordonnée qui a été assimilée aux microdomaines lipidiques existant dans les membranes biologiques (Simons and Vaz, 2004).

Les microdomaines sont des structures en bicouches lipidiques, dont les deux feuillets n'ont pas la même composition. La manière dont les deux feuillets sont associés n'est pour

l'instant pas clairement identifiée : la longueur des chaînes d'acides gras des lipides pourrait être suffisante pour s'intercaler dans toute l'épaisseur de la membrane. Une autre hypothèse est celle de la dimérisation du cholestérol dans la bicouche lipidique ou encore l'existence de protéines transmembranaires assurant la cohésion entre les deux feuillettes (Harder et al., 1998). En raison de l'insertion du cholestérol au sein de la bicouche lipidique et du compactage des lipides, les microdomaines auraient une épaisseur légèrement plus importante que la bicouche lipidique environnante (Rukmini et al., 2001). C'est l'ensemble de ces propriétés physiques qui a mené à la dénomination de « radeaux lipidiques ».

*d) Les caveolae, un sous-type de microdomaine lipidique*

Les caveolae sont des structures invaginées de la membrane plasmique, généralement en forme de petite fiole, qui ont été découvertes dans les années 1950 (Parton and Richards, 2003; Simons and Toomre, 2000). La cavéoline en est le constituant principal, et ces structures sont enrichies en cholestérol et en sphingolipides (figure 17). La communauté scientifique a considéré pendant longtemps ces structures invaginées comme les seuls microdomaines lipidiques existants. La découverte d'autres microdomaines lipidiques dépourvus de cavéolines et ne présentant pas la structure caractéristique en flasque a remis cette idée en question : à l'heure actuelle, les caveolae sont considérées comme un sous-ensemble des microdomaines lipidiques, et les radeaux dépourvus des caractéristiques de ces caveolae (en particulier leur forme) sont parfois nommés microdomaines lipidiques « plats » (Simons and Toomre, 2000). Il est important de noter ici que la composition et la structure des caveolae sont très probablement associées à une fonction spécifique : leur forme en flasque ressemble à celle des vésicules à clathrine, et de ce fait, un rôle leur a été attribué principalement dans le processus d'endocytose (Parton and Richards, 2003). Ainsi, chaque sous-type de microdomaine lipidique pourrait avoir une ou plusieurs fonctions en vertu de sa composition ou de sa morphologie particulière. Il est peu probable que les microdomaines lipidiques « plats » forment un ensemble homogène, en raison de la grande variété de processus dans lesquels ils ont été impliqués. Des sous-ensembles émergeront certainement avec l'avancée des recherches dans ce domaine.



**Figure 18 : La méthode d'isolation de DRM sur gradient de densité.**

Les DRM sont résistants à un traitement avec un détergent non-ionique (comme le Triton-X100, 30 min à 4°C). Leur forte teneur en lipides leur confère une densité faible qui permet de les séparer sur un gradient de densité. D'après (Briggs et al., 2003).

## 2) Les méthodes d'étude des microdomaines membranaires

### a) *La résistance à la solubilisation par les détergents*

La première technique utilisée pour étudier les microdomaines lipidiques tenait compte des propriétés physiques des lipides qui les composent. En effet, les glycosphingolipides peuvent s'associer latéralement entre eux et leur structure permet à des molécules de cholestérol de s'insérer entre elles, pour former un ensemble compact. Cette propriété leur confère une résistance à la solubilisation par certains détergents non-ioniques comme le Triton-X100 à 4°C, et une densité faible en raison de leur forte teneur en lipides. L'isolation biochimique de membranes résistantes aux détergents (DRM) peut donc être réalisée grâce à un traitement au Triton-X100 à 4°C suivi d'une centrifugation dans un gradient de densité, et l'association de protéines à ces DRM peut être évaluée par leur capacité à « flotter » dans les mêmes fractions que ces derniers (figure 18) (Brown and Rose, 1992; Simons and Ikonen, 1997).

Cette technique présente des limites importantes, qu'il me paraît nécessaire d'évoquer ici (Munro, 2003). Premièrement, le pourcentage de détergent utilisé peut faire varier la solubilisation de ces plate-formes lipidiques. Il est donc capital d'employer une quantité de détergent minimale pour solubiliser des protéines non associées aux rafts, tel le récepteur de la transferrine, sans pour autant décrocher les protéines qui y sont associées, comme par exemple la flotilline (Chamberlain, 2004). En effet, un traitement par un détergent trop concentré peut solubiliser les protéines associées faiblement aux microdomaines et de ce fait, l'absence d'une protéine dans les DRM ne signifie pas forcément qu'elle n'est pas associée dans les microdomaines lipidiques *in vivo* (Chamberlain, 2004). Deuxièmement, l'extraction se fait à 4°C, or la température peut jouer à la fois sur la fluidité et la solubilité des lipides (Brown, 2006; Chamberlain, 2004). Troisièmement, plusieurs études montrent que le Triton-X100 lui-même est capable d'induire la formation de agrégats enrichis en cholestérol et en sphingomyéline dans un modèle de membrane artificielle (Brown, 2006; Heerklotz et al., 2003). Pour contourner ces deux derniers inconvénients, d'autres détergents permettant une extraction à 37°C et n'induisant pas d'agrégation de lipides, comme par exemple le Brij98, ont été utilisés, mais ceci a montré que la composition lipidique et protéique des DRM isolés varie en fonction du détergent utilisé (Schuck et al., 2003). Plusieurs explications ont été émises : soit les différents détergents seraient capables de solubiliser des microdomaines différents, ce qui impliquerait qu'il y ait une diversité de ces radeaux au sein des membranes ; soit certains détergents seraient plus efficaces pour décrocher des molécules faiblement

associées aux microdomaines. Ainsi, les domaines isolés par l'usage de détergents ne correspondent peut-être pas tout à fait aux microdomaines lipidiques formés dans les membranes biologiques. C'est pourquoi le terme « membranes résistantes aux détergents » (DRM) a été choisi, afin d'éviter toute confusion avec le terme « microdomaines lipidiques » qui désigne les domaines existants *in situ* (Brown, 2006).

#### *b) La séquestration ou la déplétion du cholestérol*

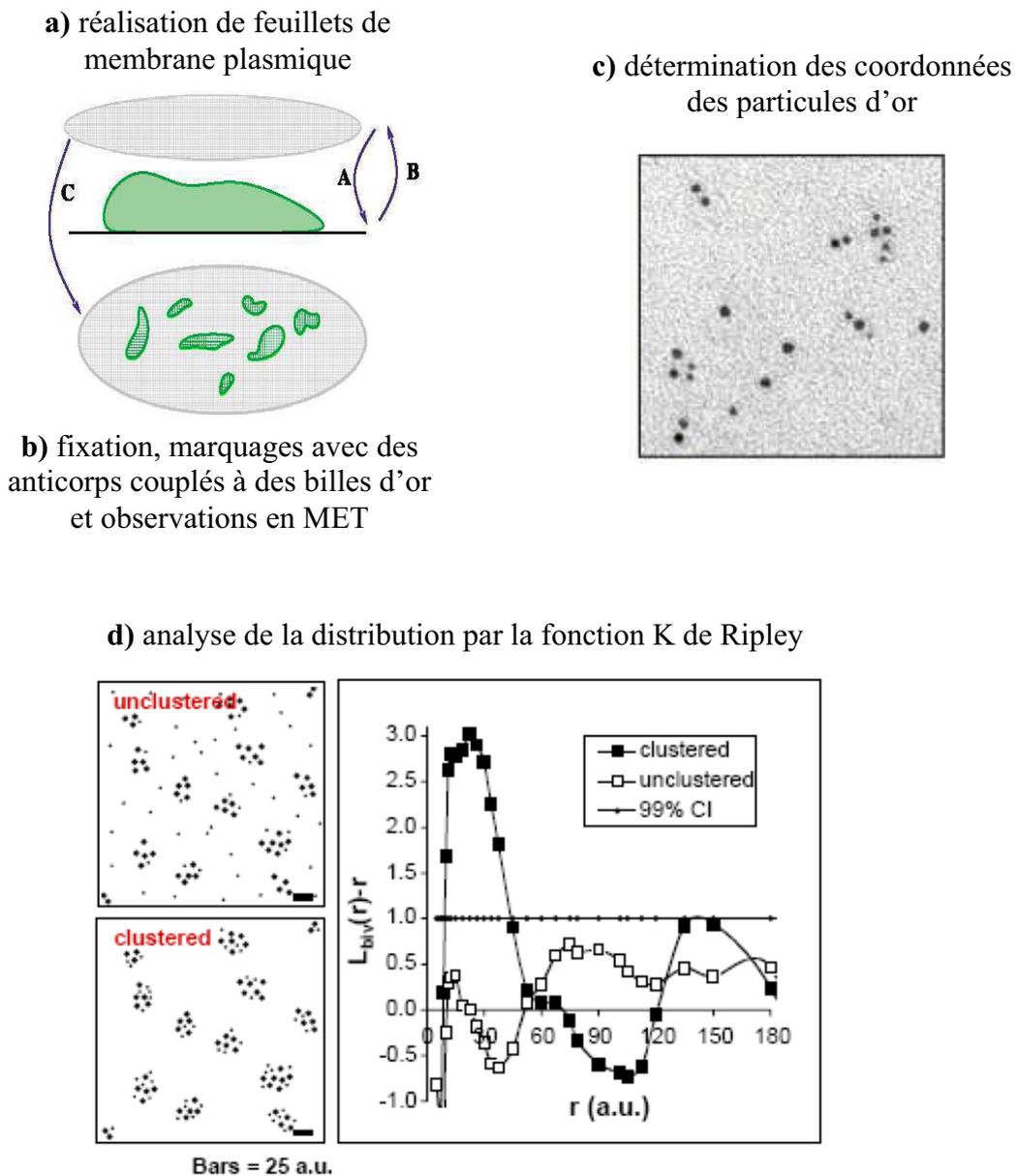
Les microdomaines lipidiques étant particulièrement enrichis en cholestérol, il est possible de varier le taux de ce lipide au moyen d'agents qui le complexent (comme la filipine), qui l'extraient (comme la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine) ou qui inhibent sa synthèse (lovastatine par exemple) et perturber ainsi l'organisation des microdomaines pour déterminer leur implication fonctionnelle (Allen et al., 2007; Awasthi-Kalia et al., 2001; Simons and Toomre, 2000). Cette approche permet aussi de tester la spécificité d'association de protéines aux DRM, puisque le traitement par ce type d'agents entraîne la destruction des radeaux et la solubilisation des protéines qui s'y trouvaient (Allen et al., 2007; Simons and Toomre, 2000). Un contrôle intéressant consiste à évaluer la réversibilité de l'effet de ces agents par la réintroduction de cholestérol (Allen et al., 2007; Simons and Toomre, 2000). Cependant, il convient encore une fois d'être prudent lors de l'utilisation d'agents modulant le taux de cholestérol : le cholestérol est un constituant majeur des microdomaines, mais il se trouve également dans les autres membranes, et d'autres processus que ceux associés aux microdomaines lipidiques peuvent donc être affectés par de tels traitements (Munro, 2003). De plus, des agents causant une déplétion ou une complexation du cholestérol peuvent avoir un effet différent en fonction du type cellulaire (Awasthi-Kalia et al., 2001), ce qui implique qu'il faille les utiliser avec circonspection. Cette technique est donc fréquemment combinée avec d'autres approches comme la purification de DRM.

#### *c) Les techniques de visualisation in situ*

La petite taille des microdomaines lipidiques les rend difficiles à détecter par des techniques de microscopie photonique classique (Simons and Toomre, 2000). C'est en grande partie pour cette raison que leur existence a été pendant très longtemps remise en cause. Toutefois, des études ont montré que des anticorps ou des toxines réticulant des composants de ces domaines sont capables de provoquer leur regroupement en plate-formes plus larges et visualisables en microscopie photonique (Harder et al., 1998). Ainsi il a été proposé que la taille de ces microdomaines puisse être modulée par l'oligomérisation de ses constituants,

apportant la notion de dynamique des microdomaines lipidiques (Harder et al., 1998; Simons and Toomre, 2000). Pour éviter toute confusion entre les petits domaines et ceux regroupés en plate-formes, j'utiliserai dans ce manuscrit respectivement les termes « nanodomaines » pour désigner les petits radeaux (moins de 100 nm) et « microdomaines » pour les radeaux plus larges (de 100 nm à plus de 1  $\mu\text{m}$ ) (Jacobson et al., 2007). Une notion particulièrement intéressante apportée par ces études (Harder et al., 1998; Simons and Toomre, 2000) est que, les nanodomaines étant difficilement détectables en microscopie photonique en raison des limites de résolution et de sensibilité de détection, les microdomaines peuvent, quant à eux, être visualisés par des techniques de marquage de certains de leurs constituants (Jacobson et al., 2007). Le ganglioside GM1 par exemple peut être détecté grâce à la toxine cholérique couplée à un fluorophore. Cette toxine est pentavalente, et présente donc une affinité plus importante pour le GM1 lorsque celui-ci est regroupé en agrégats (Arosio et al., 2004; Harder et al., 1998). L'un des principaux avantages de la détection en microscopie photonique est qu'elle permet de s'affranchir des détergents, et donc de détecter des microdomaines *in situ*. Toutefois la résolution optique d'une telle technique ne permet pas l'observation des nanodomaines (Hancock, 2006; Simons and Toomre, 2000).

Plusieurs autres techniques d'imagerie au niveau ultrastructural sur des membranes intactes ont donc été développées, comme la microscopie électronique à transmission sur des feuillettes de membrane plasmique (Hancock, 2006; Hancock and Prior, 2005). Cette dernière technique est particulièrement intéressante parce qu'elle permet la visualisation de domaines membranaires très petits non visibles en microscopie optique (Wilson et al., 2004). Le principe de la technique consiste à appliquer une grille de microscopie électronique sur la surface des cellules et à appuyer fortement pour y faire adhérer la membrane plasmique supérieure (figure 19). En retirant la grille, une partie de membrane est arrachée, emportant avec elle les éléments du cytosquelette et les organites cellulaires qui y sont arrimés. Il est donc possible d'obtenir des images de la face interne de la membrane plasmique dans une configuration proche de celle existant dans les cellules intactes. Différents marquages avec des particules d'or colloïdal de tailles variables peuvent être réalisés et visualisés en microscopie électronique à transmission. Les marquages d'éléments de la surface externe (comme le marquage des microdomaines lipidiques avec la toxine cholérique) sont réalisés avant la préparation des feuillettes de membrane, et les éléments intracellulaires peuvent être marqués après cette étape. Cette technique s'affranchissant de l'utilisation de détergents, il est raisonnable de penser que les nano- ou microdomaines observés existent de manière physiologique (Hancock and Prior, 2005; Wilson et al., 2004). Un autre avantage de cette



**Figure 19 : Préparation de feuillets de membrane plasmique et analyse statistique d'immunomarquages à l'or colloïdal par la fonction K de Ripley.**

**a)** Les feuillets de membrane plasmique sont réalisés en appliquant fortement une grille de microscopie électronique sur des cellules en culture. En retirant la grille, la membrane plasmique est rompue, laissant sur la grille des feuillets de membrane avec la face cytoplasmique vers le haut. **b)** Les protéines d'intérêt sont marquées à l'aide d'un anticorps spécifique puis d'un anticorps secondaire couplé à une bille d'or colloïdal. Les marquages peuvent également être réalisés avant l'étape a) pour visualiser des composants du feuillet membranaire externe. **c)** Après observation au microscope électronique à transmission, les coordonnées de chaque particule sont déterminées. **d)** La fonction K de Ripley permet de déterminer la formation de clusters d'un type de particule d'or, mais également la coclusterisation de deux types de particules. D'après (Hancock and Prior, 2005).

technique est qu'elle permet une analyse statistique des marquages par la fonction K de Ripley, et donc l'évaluation de la formation de agrégats ou de la colocalisation de deux molécules. Grâce à cette technique, des nanodomains de compositions différentes et leur association en microdomaines lipidiques ont pu être mis en évidence au sein des membranes intactes de mastocytes (Wilson et al., 2004). Au cours de ma thèse, j'ai utilisé cette technique et les résultats obtenus sont présentés dans la seconde partie de ce manuscrit.

Une autre technique particulièrement intéressante pour visualiser les microdomaines lipidiques à une échelle ultrastructurale est la microscopie à force atomique. Cette technique est basée sur le fait que la topographie des microdomaines lipidiques est différente de celle des membranes environnantes en vertu de leurs propriétés physiques (voir paragraphe 1c). A l'heure actuelle cette technique est essentiellement utilisée *in vitro* sur des membranes reconstituées (Jacobson et al., 2007). Une étude récente a pu mettre en évidence l'importance du cholestérol dans la formation de microdomaines lipidiques : en effet, plus le taux de cholestérol est important, plus les lipides s'assemblent en structures de type microdomaines lipidiques (Lawrence et al., 2003). Il est possible de coupler cette technique avec la microscopie à fluorescence pour obtenir des précisions sur la composition des microdomaines de différentes topographies étudiés (Lin et al., 2006; Shaw et al., 2006). L'utilisation d'une telle technique sur des membranes biologiques permettra sans doute d'apporter de nombreuses informations, sur la taille ou le niveau d'organisation des radeaux lipidiques tels qu'ils existent *in situ*.

#### d) Conclusion

Au cours de ce paragraphe, nous avons pu voir que l'étude des microdomaines lipidiques n'est pas chose facile. De nombreuses techniques ont été mises en œuvre pour les mettre en évidence, étudier leur composition ou leur dynamique d'agrégation. A cause des différentes limites de ces techniques, la grande majorité des scientifiques se penchant sur le sujet considère qu'il est nécessaire de les associer pour obtenir des informations les plus proches de la réalité. L'association d'une protéine dans les DRM n'est pas suffisante pour prouver la présence d'une protéine dans les microdomaines lipidiques, mais si cette association est sensible à la modification du taux de cholestérol et si il y a une colocalisation de cette protéine avec des marqueurs de microdomaines lipidiques comme le GM1 à la fois en microscopie photonique et électronique, alors cette association peut raisonnablement être considérée comme existante *in vivo* (Allen et al., 2007; Chamberlain, 2004; Jacobson et al., 2007; Lafont and van der Goot, 2005; Simons and Toomre, 2000). A l'heure actuelle, ces techniques de

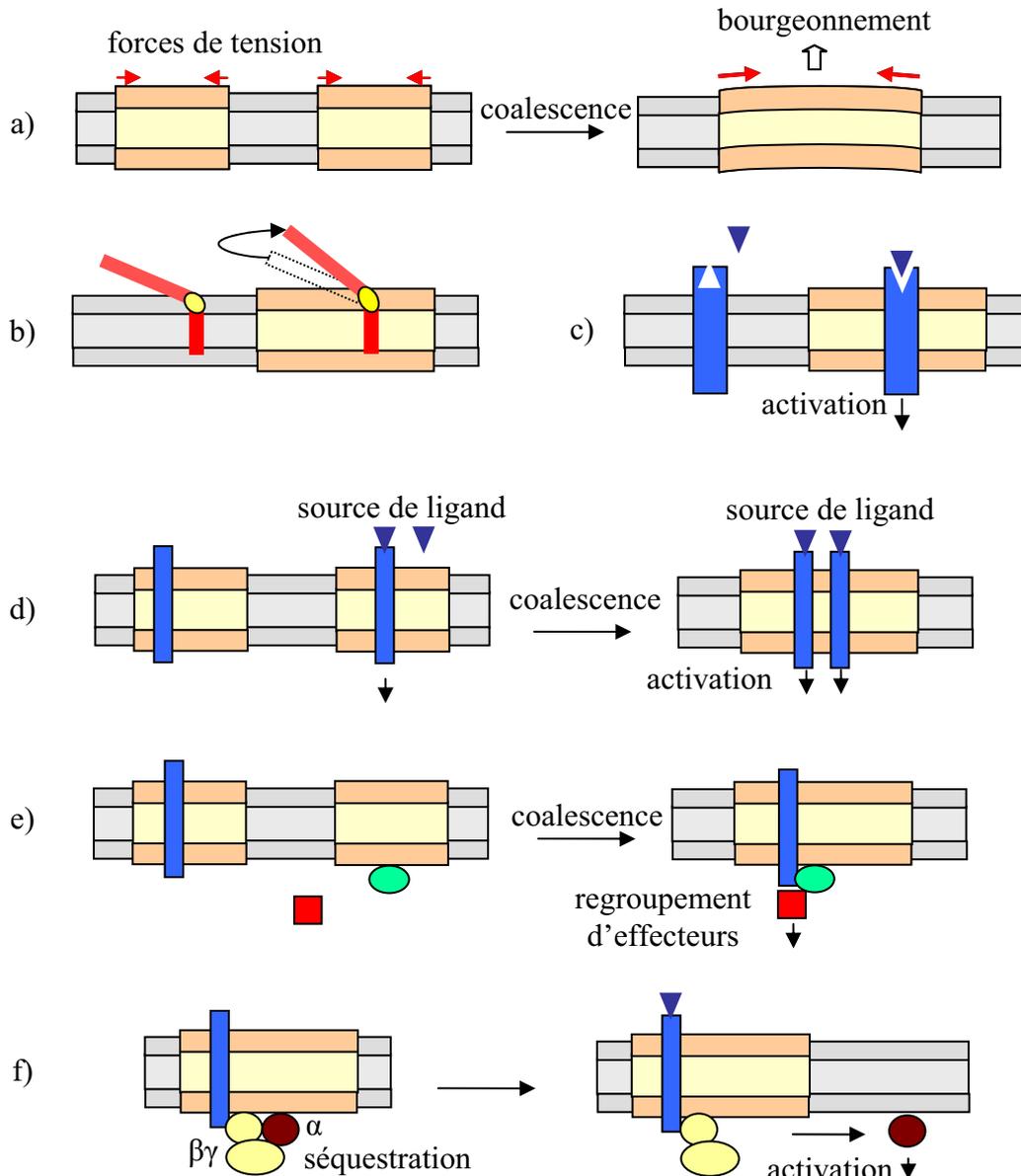
microscopie photonique et électronique ne permettent pas encore de déterminer la dynamique de formation des microdomaines. Pour ce type d'études, d'autres techniques ont été (ou sont encore) développées, comme le suivi d'une particule unique (SPT : single particle tracking), la fluorescence par transfert d'énergie de résonance (FRET : fluorescence resonance energy transfer), ou la fluorescence par spectroscopie de corrélation (FCS : fluorescence correlation spectroscopy)(Allen et al., 2007). Cette dernière technique, couplée à la microscopie confocale, mesure des fluctuations d'intensité de fluorescence liées à la diffusion des fluorophores dans une zone définie. Ceci permet d'évaluer dans des cellules vivantes la cinétique de regroupement de microdomaines lipidiques (Wawrezynieck et al., 2005). Des études menées par FCS ont permis de montrer que des lipides ou des protéines ancrés par un motif GPI sont confinés transitoirement dans des microdomaines lipidiques en présence de cholestérol et de sphingomyéline, et que ce processus est indépendant de l'intégrité du cytosquelette d'actine. Ceci montre l'importance des lipides dans le comportement dynamique des constituants des microdomaines lipidiques (Lenne et al., 2006).

### **III) Les modes d'action des microdomaines lipidiques**

Les microdomaines lipidiques sont des structures intervenant dans des processus biologiques très variés. Au cours de ce chapitre, j'ai choisi de présenter les différents moyens permettant aux microdomaines lipidiques de moduler les événements membranaires (figure 20) : je décrirai tout d'abord les rôles liés aux propriétés physiques des microdomaines, puis j'aborderai la régulation par ces radeaux de la conformation et de l'activité des protéines, et enfin je traiterai de la capacité des microdomaines lipidiques à recruter ou exclure certains composants et donc à réguler l'association de complexes multimoléculaires. Ces différents modes d'actions seront illustrés par quelques exemples, choisis parmi la grande diversité des processus physiologiques régulés par les microdomaines lipidiques. Je montrerai également que les microdomaines peuvent constituer des portes d'entrée pour un certain nombre de pathogènes.

#### **1) Les rôles liés aux propriétés physiques des microdomaines lipidiques**

Les propriétés physiques des microdomaines lipidiques, en particulier leur fluidité réduite et leur densité par rapport à la membrane environnante, jouent un rôle important dans les événements faisant intervenir des courbures de la membrane. Ceci est particulièrement bien illustré lors la formation des vésicules de transport (Rajendran and Simons, 2005; Schuck and Simons, 2004). En effet, à l'interface entre les microdomaines lipidiques et la membrane environnante s'exerce une force appelée tension de ligne, qui augmente en fonction de la différence d'épaisseur et de la composition des deux phases membranaires. Le regroupement de nanodomaines en microdomaines permettrait de diminuer la tension de ligne à l'interface entre ces radeaux et la membrane environnante en restreignant leur périmètre d'interaction. Le bourgeonnement des microdomaines favoriserait encore cette diminution de la tension de ligne (Garcia-Saez et al., 2007) et rendraient la courbure et le bourgeonnement des microdomaines énergétiquement plus favorable que leur maintien dans la membrane (figure 20a) (Schuck and Simons, 2004). D'autres phénomènes viendraient renforcer cet effet, comme par exemple la courbure des membranes due à l'asymétrie des deux feuillettes membranaires, à des forces de traction exercées par des moteurs moléculaires, ou encore à des



**Figure 20 : Les modes d'action des microdomaines lipidiques.**

Les nano- et microdomaines lipidiques sont représentés en orangé et la bicouche lipidique environnante en gris. **a)** Les forces de tension de ligne exercées à l'interface entre les radeaux lipidiques et la membrane environnante diminuent lors de leur coalescence, permettant leur bourgeonnement. **b)** Exemple de changement de conformation : la syntaxine (rouge) possède un domaine flexible (jaune) qui se réoriente et se solidifie lorsque la protéine se trouve dans les radeaux lipidiques. **c)** La modification de la liaison d'un ligand (bleu foncé) sur son récepteur (bleu clair) lorsque celui-ci se trouve dans les radeaux lipidiques affecte ses capacités d'activation. **d)** la coalescence de nanodomains en microdomaines permet la formation de clusters de récepteurs pour augmenter la signalisation ou **e)** regroupe des complexes de signalisation (vert et rouge). **f)** Exemple de régulation négative : les radeaux lipidiques séquestrent des protéines G hététrimériques. Sous l'effet d'une stimulation du récepteur, la sous-unité  $\alpha$  est dissociée et exerce son action hors des microdomaines lipidiques.

forces de constriction du « cou » de la vésicule naissante grâce à la dynamine (Kreitzer et al., 2000; Schuck and Simons, 2004).

L'épaisseur plus importante des microdomaines lipidiques par rapport aux membranes environnantes peut aussi affecter les propriétés physiques de certaines protéines, comme par exemple leur flexibilité. Le domaine transmembranaire de la syntaxine 1A comporte des inflexions, qui, en raison de la surépaisseur des microdomaines lipidiques, se trouvent réorientées et consolidées dans ces radeaux (Figure 20b). Ce changement de conformation, additionné à l'effet de renforcement de la membrane dû à la densité des radeaux, permettrait d'exercer une traction plus importante sur la membrane lors de la formation du complexe SNARE et donc de faciliter les étapes ultérieures de l'exocytose (Knecht and Grubmuller, 2003; Salaun et al., 2004a).

## **2) La régulation de la conformation et de l'activité de protéines**

Un grand nombre de protéines transmembranaires voient leur activité modifiée en fonction de leur localisation ou non dans des microdomaines lipidiques. C'est notamment le cas des récepteurs métabotropiques et ionotropiques (Allen et al., 2007) et de nombreux canaux ioniques (Maguy et al., 2006; Martens et al., 2004). Nous verrons ici deux exemples : la conformation des récepteurs métabotropiques de la sérotonine et la régulation de la conductance ionique à travers un canal dépendant du voltage, le canal P/Q.

Les changements de conformation induits par les microdomaines lipidiques peuvent être responsables de l'augmentation d'affinité d'une protéine pour ses partenaires (figure 20c). Ce type de régulation est particulièrement intéressant dans le cas de la liaison d'un ligand, comme par exemple un neurotransmetteur, sur son récepteur (Allen et al., 2007). Ainsi, les microdomaines lipidiques ont été impliqués dans la régulation de récepteurs couplés aux protéines G tels que les récepteurs de la sérotonine. La déplétion en cholestérol induit une réduction de la liaison du neurotransmetteur sur le récepteur 5HT7, ainsi que celle d'agonistes et d'antagonistes de ce récepteur (Sjogren et al., 2006). Dans ce cas, la présence des microdomaines lipidiques est donc essentielle à la réception du signal.

L'activité d'autres types de protéines transmembranaires, comme des canaux ioniques, peut être affectée par les microdomaines lipidiques. De manière tout à fait intéressante, la présence des canaux calciques de type P/Q dépendant du voltage (Cav2.1) dans des microdomaines lipidiques des terminaisons synaptiques est couplée à la présence dans ces mêmes domaines des protéines du complexe SNARE. Ceci pourrait donc constituer un mode

de couplage entre l'influx calcique et le processus d'exocytose impliquant les protéines SNARE (Taverna et al., 2004). La perturbation des microdomaines lipidiques intervient dans la localisation de ces protéines, mais diminue également l'influx calcique dans l'élément présynaptique, soit en modifiant directement la conformation du canal, soit en empêchant son interaction avec des régulateurs de son activité (Taverna et al., 2004). Là encore, on peut constater que l'intégrité des microdomaines lipidiques est nécessaire au fonctionnement des canaux calciques, et par voie de conséquence, au couplage entre canaux calcique et exocytose.

### **3) La régulation de la formation de complexes moléculaires de signalisation**

#### *a) La formation d'agrégats de récepteurs*

L'un des modes de régulation de l'activité des récepteurs consiste en leur regroupement en agrégats dans une zone spécifique. La formation de ces agrégats peut ainsi permettre une meilleure réception du signal en rapprochant ces récepteurs de la source de ligand (figure 20d). A la jonction neuromusculaire, la formation d'agrégats de récepteurs nicotiques de l'acétylcholine est provoquée par l'agrine. Celle-ci induit une cascade de signalisation impliquant MuSK (Muscle specific receptor tyrosine kinase), qui est alors transloquée dans les radeaux lipidiques. Ceci provoque la relocalisation des récepteurs nicotiques dans des microdomaines, où ils sont ancrés par la rapsyne. On peut noter également que le couplage entre la cascade de signalisation MuSK et la formation de agrégats pourrait faire intervenir le cytosquelette d'actine et notamment la petite GTPase Rac1 dont l'activation est inhibée par la déstructuration des radeaux (Zhu et al., 2006).

La formation d'agrégats de récepteurs est également importante dans le cadre de l'apoptose. Dans ce cas, ce regroupement permet d'augmenter fortement la signalisation induite par un signal apoptotique. L'activation de récepteurs apoptotiques provoque la translocation d'une enzyme, la sphingomyélinase, vers le feuillet externe de la membrane plasmique, où elle est localisée dans les microdomaines lipidiques. Grâce à cette enzyme, les sphingolipides des radeaux sont métabolisés en céramides qui peuvent s'associer entre eux pour former des plate-formes larges ou macrodomaines (Gulbins and Li, 2006). Une des hypothèses formulées pour expliquer le rôle de ces macrodomaines dans l'apoptose est que ces domaines pourraient permettre de former des agrégats de récepteurs encore plus grands, amplifiant ainsi leur effet par une sorte de rétroaction positive. C'est notamment le cas du

récepteur CD95, qui grâce à la formation d'agrégats par les domaines lipidiques enrichis en céramide voit sa signalisation augmenter d'un facteur 100 (Gulbins and Li, 2006).

*b) La formation de complexes multimoléculaires*

Une autre hypothèse sur le rôle des microdomaines lipidiques est qu'ils pourraient participer au regroupement de molécules de signalisation ou d'effecteurs avec les récepteurs, de manière à activer la cascade de signalisation (figure 20e). Cette hypothèse est à l'heure actuelle la mieux documentée.

La première cascade de signalisation dans laquelle les microdomaines lipidiques ont été impliqués est celle des immunoglobulines E (IgE) lors de la réponse immunitaire des mastocytes. Ces immunoglobulines se lient par leur segment Fc sur le récepteur FcεRI situé dans la membrane plasmique. La réticulation des immunoglobulines par les antigènes provoque le recrutement de FcεRI dans les DRM, ce qui permet la phosphorylation de ces récepteurs par la tyrosine kinase Lyn. FcεRI peut alors s'associer avec une autre tyrosine kinase, Syk, qui initie la cascade de signalisation conduisant à la dégranulation et donc à la libération d'histamine (Field et al., 1995; Rajendran and Simons, 2005; Simons and Toomre, 2000). Plus récemment, une étude a montré que la kinase Lyn est redistribuée dans les microdomaines contenant FcεRI de manière dépendante du cytosquelette d'actine (Wu et al., 2004).

Les microdomaines lipidiques peuvent également servir au regroupement d'effecteurs avec leurs propres substrats et donc intervenir également plus avant dans la cascade de signalisation. Dans les lymphocytes T, la phospholipase Cγ1 (PLCγ1) subit une translocation du cytosol vers les microdomaines lipidiques suite à l'activation des TCR (T-cell receptor). L'expression de cette phospholipase, modifiée avec des signaux d'adressage aux radeaux lipidiques, dans des cellules qui n'expriment normalement pas cette protéine, induit son activation constitutive par phosphorylation. Ainsi la translocation de la PLCγ1 dans les microdomaines est suivie de son activation et donc de celle de la cascade de signalisation qui en découle (Veri et al., 2001). Le même phénomène de translocation dans les microdomaines lipidiques suivie d'une phosphorylation se produit pour la PLCγ2 dans des lymphocytes B suite à l'activation des BCR (B-cell receptor) (Aman and Ravichandran, 2000). Dans les astrocytes, la PLCβ et la PKCα sont recrutées dans les microdomaines lipidiques par une stimulation purinergique, et la perturbation des radeaux aboutit à un ralentissement des vagues calciques (Allen et al., 2007; Weerth et al., 2007).

Nous avons vu jusqu'ici que les propriétés des microdomaines lipidiques affectaient le recrutement, la conformation, et l'activation des protéines. Ces microdomaines peuvent également induire une ségrégation des protéines de manière à empêcher leur interaction avec leurs effecteurs, et donc les maintenir inactives jusqu'à la stimulation par un signal approprié (figure 20f). C'est notamment le cas pour certaines protéines G hétérotrimériques, composées des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$ , qui sont généralement couplées à des récepteurs à 7 domaines transmembranaires. Beaucoup de ces protéines G ont été associées aux microdomaines lipidiques (Allen et al., 2007). La liaison d'un ligand sur le récepteur provoque l'échange du GDP en GTP sur la sous-unité  $\alpha$ , permettant sa dissociation des sous-unités  $\beta\gamma$ . La sous-unité  $G\alpha$  dissociée est alors responsable de l'activation subséquente d'une partie des voies de signalisation. Une étude intéressante montre que la perturbation des microdomaines lipidiques augmente légèrement l'activité de signalisation par Gas (Miura et al., 2001), ce qui semble indiquer que ces radeaux participeraient à la séquestration de la forme hétérotrimérique (inactive), et que Gas, une fois dissociée, exercerait son activité en dehors des microdomaines. L'arrêt de la signalisation se fait grâce à l'intervention de protéines régulatrices de la signalisation des protéines G, les RGS (regulator of G-protein signaling), qui stimulent l'activité GTPasique de la sous-unité  $\alpha$  et sa réassociation aux deux autres sous-unités (McCudden et al., 2005). Certaines RGS sont associées aux radeaux lipidiques, et cette localisation pourrait être nécessaire pour l'arrêt de la signalisation (Allen et al., 2007).

*c) La ségrégation de voies de signalisation impliquant des effecteurs communs*

En général, une même molécule de signalisation est capable d'activer plusieurs effecteurs différents, et à l'inverse, des molécules différentes peuvent intervenir sur les mêmes effecteurs. Pour permettre la discrimination entre ces voies qui s'entrecroisent et peuvent aboutir à des effets contraires, la séparation physique et/ou temporelle des différents acteurs est indispensable et nécessite parfois l'intervention des microdomaines lipidiques.

Parmi les petites GTPases, les protéines Ras agissent comme des interrupteurs moléculaires capables de recruter et d'activer des effecteurs, tels que la phosphatidyl-inositol 3-kinase (PI3K) ou les sérine/thréonine kinases Raf qui activent la voie des MAP kinases (Mitogen-Activated Protein Kinase) et régulent la croissance et la différenciation cellulaires. Il existe plusieurs isoformes de Ras, qui bien que très proches en séquence protéique et interagissant avec les mêmes activateurs et effecteurs, n'ont pas les mêmes propriétés de signalisation (Hancock, 2003). L'isoforme H-Ras est capable d'interagir avec des microdomaines lipidiques contenant de la cavéoline. Ces domaines semblent essentiels pour

la signalisation de H-Ras, alors que leur perturbation n'affecte pas la signalisation de K-Ras (Roy et al., 1999). Curieusement, d'autres études ont montré que seule la forme inactive de H-Ras se trouvait dans les caveolae, et que son activation provoquait son exclusion de ces domaines sans toutefois qu'il y ait de mélange avec son isoforme K-Ras (Hancock, 2003). Dans les cellules T Jurkat, H-Ras aussi bien que K-Ras sont associées à des radeaux lipidiques enrichis en GM1, mais de compositions différentes. La différence de localisation de ces deux protéines peut être expliquée par le fait que H-Ras est palmitoylée et s'insérerait directement dans le feuillet cytoplasmique des microdomaines, alors que K-Ras porte un domaine polybasique d'association aux membranes, capable de s'associer au PIP2 qui n'est présent que dans certains microdomaines (Parmryd et al., 2003). Ainsi, les différentes isoformes de Ras seraient ségréguées dans des domaines membranaires séparés, contenant par exemple des cofacteurs ou des substrats différents, qui leur permettraient d'avoir des rôles distincts (Hancock, 2003; Roy et al., 1999; Simons and Toomre, 2000).

#### **4) Les microdomaines lipidiques : porte d'entrée pour certains pathogènes**

La reconnaissance et l'internalisation de certains pathogènes passent également par des microdomaines lipidiques (Lafont et al., 2004; Lafont and van der Goot, 2005; Manes et al., 2003). Ainsi, ces structures peuvent servir de porte d'entrée pour des virus tels que le VIH ou le virus de la forêt de Semliki, pour un grand nombre de bactéries dont *Escherichia coli*, *Mycobacterium* spp, *Salmonella typhimurium* ou *Shigella flexneri*, et pour des parasites comme *Plasmodium falciparum*. Les microdomaines lipidiques sont aussi les cibles d'un certain nombre de toxines, par exemple la toxine cholérique, la toxine tétanique, ou la toxine botulique. La plupart de ces pathogènes utilisent, pour pénétrer dans les cellules, les voies de phagocytose ou d'endocytose par les microdomaines lipidiques, qui aboutissent généralement à une fusion avec les compartiments de dégradation. Les pathogènes ont donc un intérêt particulier à détourner la machinerie de manière à assurer leur survie. Par exemple, la bactérie *Shigella* utilise les microdomaines lipidiques pour se lier et pénétrer dans la cellule hôte (Lafont et al., 2002; van der Goot et al., 2004). Ce processus passe par l'insertion dans les microdomaines lipidiques de l'hôte d'une « seringue protéique », le T3SS (type III secretion system), qui permet à la bactérie d'injecter dans la cellule des effecteurs qui vont notamment modifier le cytosquelette d'actine et permettre son internalisation. Une fois ingérée, la bactérie s'échappe de la vacuole, par un mécanisme qui pourrait faire intervenir la déstabilisation des microdomaines lipidiques qui s'y trouvent (Lafont and van der Goot,

2005). Le parasite *Plasmodium falciparum* forme aussi activement une vacuole qui permet son internalisation en recrutant des microdomaines lipidiques de l'hôte, et utiliserait ensuite ces microdomaines pour empêcher la fusion de la vacuole avec les lysosomes (Lauer et al., 2000).

De plus, la libération de certains virus (dont le VIH) se fait par bourgeonnement au niveau des microdomaines lipidiques. L'enveloppe membranaire de ces virus comporte alors des radeaux lipidiques des cellules hôtes, ce qui pourrait faciliter l'infection d'une nouvelle cellule en perturbant les mécanismes de reconnaissance (Manes et al., 2003). La compréhension des mécanismes de formation et de régulation des microdomaines lipidiques pourrait donc permettre de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour un grand nombre de pathologies.

#### **IV) La formation et la régulation des microdomaines lipidiques.**

La compréhension des modes de formation et de régulation des microdomaines lipidiques est un sujet très actuel. Plusieurs hypothèses coexistent, et vu l'importance physiologique des microdomaines, il est probable que ces mécanismes soient complexes et étroitement surveillés.

La formation des radeaux lipidiques dans des modèles de membranes *in vitro* consiste en une association spontanée de lipides en fonction de la phase dans laquelle ils se trouvent (Bandorowicz-Pikula, 2000; Simons and Vaz, 2004). Dans les membranes biologiques, la situation est plus complexe, en raison de la présence de protéines dans la bicouche lipidique. Ces protéines peuvent interagir latéralement entre elles et avec des lipides, ce qui entraîne un niveau d'organisation supplémentaire des radeaux lipidiques (Bandorowicz-Pikula, 2000). Les nanodomaines lipidiques dans les membranes biologiques pourraient donc être le résultat d'une association latérale spontanée entre les lipides et protéines qui les constituent (Simons and Vaz, 2004). Il est tout à fait possible que ces nanodomaines soient maintenus séparés les uns des autres, de manière à maintenir à l'état inactif des fonctions auxquelles ils sont associés. Sous l'effet de l'activation d'une fonction cellulaire, ces nanodomaines peuvent être regroupés en microdomaines lipidiques (Allen et al., 2007; Harder et al., 1998; Simons and Toomre, 2000). Des protéines capables d'interagir avec plusieurs lipides ou protéines de ces nanodomaines sont capables d'induire le recrutement latéral de plusieurs d'entre eux, et donc leur coalescence en microdomaines. La dynamique des radeaux peut être causée par des facteurs extracellulaires comme des anticorps ou des toxines. Par exemple, la formation de agrégats de protéines à ancre GPI grâce à des anticorps est capable d'induire formation de microdomaines lipidiques (Pike, 2003; Simons and Ikonen, 1997). Il est également possible qu'un regroupement des nanodomaines se fasse grâce à des facteurs intracellulaires (Simons and Toomre, 2000). Ceci a été décrit pour des protéines de la famille des annexines, en particulier l'annexine A2, ou pour certaines protéines à domaines C2 (domaines pouvant lier le calcium et des phospholipides) ou PH (pleckstrin homology : domaine de liaison au PIP2) (Bandorowicz-Pikula, 2000). Ainsi, la formation et la stabilisation de microdomaines lipidiques est un phénomène qui se produit activement grâce à l'intervention de facteurs intracellulaires ou extracellulaires capables de les organiser.



## **A. Les sites d'exocytose : des microdomaines lipidiques formés par l'annexine A2 ?**

### **I) Introduction**

En raison de leur capacité à sélectivement recruter ou exclure certains composants protéiques, les microdomaines lipidiques sont impliqués dans le trafic membranaire, où ils formeraient des plate-formes de tri sélectif pour l'adressage d'un compartiment cellulaire à l'autre. Le maintien de la polarité cellulaire illustre bien ce rôle des microdomaines lipidiques. Ainsi, dans le transport apical de cellules épithéliales rénales et intestinales, des microdomaines lipidiques seraient formés ou stabilisés par l'annexine A13b pour inclure les protéines apicales et exclure les protéines basolatérales (Lafont et al., 1998; Lecat and Lafont, 1999; Schuck and Simons, 2004). Les microdomaines lipidiques ont également été impliqués dans un autre processus du trafic membranaire, l'endocytose. Ce mécanisme d'endocytose représente une alternative à celui faisant intervenir les vésicules à clathrine, dépourvues de microdomaines lipidiques (Hanzal-Bayer and Hancock, 2007; Rajendran and Simons, 2005). Comme dans le cas de la régulation de la polarité cellulaire, il semble que les microdomaines lipidiques soient responsables d'une forme de tri et d'adressage des éléments internalisés à des compartiments intracellulaires précis. Ainsi, des protéines à ancrage GPI peuvent internalisées *via* des caveolae ou des microdomaines lipidiques puis transportées respectivement dans des compartiments cellulaires nommés cavéosomes ou GEEC (endosomes précoces enrichis en protéines à ancrage GPI) (Hanzal-Bayer and Hancock, 2007; Lamaze et al., 2001; Parton and Richards, 2003; Rajendran and Simons, 2005; Sabharanjak et al., 2002).

L'implication des microdomaines lipidiques dans le trafic membranaire semble donc étroitement liée à la régulation spatiale des événements. Dans ce contexte, il nous est apparu intéressant d'envisager qu'un tel rôle intervienne également dans la régulation de l'exocytose. En effet, le processus de sécrétion regroupe un grand nombre de partenaires protéiques et lipidiques dont l'organisation en une machinerie efficace requiert une régulation spatiotemporelle très stricte. La présence de certaines protéines de l'exocytose comme les protéines du complexe SNARE dans des microdomaines lipidiques (Chamberlain et al., 2001;

Lang et al., 2001) appuyait l'hypothèse selon laquelle des radeaux lipidiques participeraient à l'organisation des sites de sécrétion. Nous avons donc cherché dans quelle mesure ces microdomaines pouvaient être impliqués dans un tel processus.

La participation de l'annexine A2 dans l'exocytose avait déjà été proposée (Ali et al., 1989; Chasserot-Golaz et al., 1996; Gerke and Moss, 2002; Sarafian et al., 1991). Lors de mon arrivée au laboratoire, l'implication fonctionnelle directe de l'annexine A2 dans l'exocytose venait d'être mise en évidence en modifiant l'expression endogène de la protéine dans les cellules chomaffines : en effet, la diminution du taux d'annexine A2 fonctionnelle s'avérait inhiber la sécrétion. De plus, l'absence d'annexine A2 fonctionnelle diminuait fortement le nombre d'évènements de sécrétion mesuré par ampérométrie, indiquant que l'annexine A2 jouerait un rôle principalement dans les étapes tardives d'arrimage et/ou dans l'amorçage du processus exocytotique (Chasserot-Golaz et al., 2005). A ce stade des recherches, il restait à trouver la fonction précise de cette protéine dans les rouages de l'exocytose. La capacité de l'annexine 2 à se lier à l'actine suggérait qu'elle pourrait participer à l'étape de réorganisation du cytosquelette d'actine, nécessaire à l'exocytose (Babiyshuk et al., 1999; Harder et al., 1997) or les résultats obtenus montrent que ce n'est pas le cas. L'autre cible possible de l'annexine 2 était les lipides (Ayala-Sanmartin et al., 2000; Ayala-Sanmartin et al., 2001) : en effet, l'annexine A2 a des caractéristiques structurales lui permettant d'agir sur l'organisation des membranes en promouvant la formation de microdomaines lipidiques de manière dépendante du calcium (Babiyshuk and Draeger, 2000; Babiyshuk et al., 2002; Bandorowicz-Pikula, 2000; Mayran et al., 2003). Nous avons donc recherché si l'annexine A2 pouvait former des microdomaines lipidiques au niveau des sites de sécrétion.

## **II) Publication 1**

Chasserot-Golaz S., Vitale N., **Umbrecht-Jenck E.**, Knight D., Gerke V. and Bader M. F.. Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles. (2005) *Mol Biol Cell* 16, 1108-19.

# Annexin 2 Promotes the Formation of Lipid Microdomains Required for Calcium-regulated Exocytosis of Dense-Core Vesicles

Sylvette Chasserot-Golaz,\* Nicolas Vitale,\* Emeline Umbrecht-Jenck,\*  
Derek Knight,<sup>†</sup> Volker Gerke,<sup>‡</sup> and Marie-France Bader\*

\*Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Propre de Recherche 2356, IFR 37 des Neurosciences, 67084 Strasbourg Cedex, France; <sup>†</sup>Biomedical Sciences, Kings College London, London SE1 1U, United Kingdom; and <sup>‡</sup>Institute for Medical Biochemistry, Center for Molecular Biology of Inflammation, University of Münster, D-48149 Münster, Germany

Submitted July 23, 2004; Revised November 24, 2004; Accepted December 16, 2004  
Monitoring Editor: Anthony Bretscher

**Annexin 2 is a calcium-dependent phospholipid-binding protein that has been implicated in a number of membrane-related events, including regulated exocytosis. In chromaffin cells, we previously reported that catecholamine secretion requires the translocation and formation of the annexin 2 tetramer near the exocytotic sites. Here, to obtain direct evidence for a role of annexin 2 in exocytosis, we modified its expression level in chromaffin cells by using the Semliki Forest virus expression system. Using a real-time assay for individual cells, we found that the reduction of cytosolic annexin 2, and the consequent decrease of annexin 2 tetramer at the cell periphery, strongly inhibited exocytosis, most likely at an early stage before membrane fusion. Secretion also was severely impaired in cells expressing a chimera that sequestered annexin 2 into cytosolic aggregates. Moreover, we demonstrate that secretagogue-evoked stimulation triggers the formation of lipid rafts in the plasma membrane, essential for exocytosis, and which can be attributed to the annexin 2 tetramer. We propose that annexin 2 acts as a calcium-dependent promoter of lipid microdomains required for structural and spatial organization of the exocytotic machinery.**

## INTRODUCTION

Annexins form an evolutionary conserved multigene family of proteins with members being expressed throughout the plant and animal kingdoms. The common characteristic of annexins is that they bind to negatively charged phospholipids in biological membranes in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner (for review, see Creutz, 1992; Gerke and Moss, 2002). As such, annexins have been implicated in various membrane trafficking events, including exocytosis, endocytosis, and cell-to-cell adhesion (Lecat and Lafont, 1999). The most compelling evidence for involvement in calcium-regulated exocytosis has been reported for annexin 2. Endogenous annexin 2 exists in part as a soluble monomer, p36, and in part as a heterotetrameric complex, p90, with its specific ligand the S100A10 protein also called p11 (Schafer and Heizmann, 1996). When complexed, the central S100A10 dimer links two annexin 2 chains in a highly symmetrical manner, creating a scaffold that can bridge opposing membrane surfaces (Lambert *et al.*, 1997; Rety *et al.*, 1999; Lewit-Bentley *et al.*, 2000). Quick-freeze, deep-etch electron microscopic analysis has documented that annexin 2 forms cross-links between secretory granules and the plasma membrane in stimulated neuroendocrine cells (Nakata *et al.*, 1990; Senda *et al.*, 1994).

In chromaffin cells, we (Sarafian *et al.*, 1991) and others (Ali *et al.*, 1989) have identified annexin 2 as one of the cytosolic proteins that can retard the rundown of secretory responsiveness to Ca<sup>2+</sup> stimulation of permeabilized cells when added exogenously as a purified protein. In our assay, the tetrameric complex was more efficient than the monomeric annexin 2 protein, and phosphorylation by protein kinase C (PKC) was required (Sarafian *et al.*, 1991). More recently, we demonstrated that a synthetic peptide corresponding to an NH<sub>2</sub>-terminal annexin 2 sequence containing the PKC phosphorylation site inhibits catecholamine secretion in response to nicotine when microinjected into chromaffin cells (Chasserot-Golaz *et al.*, 1996). Together, these results strongly suggested, but did not prove, that annexin 2 plays an important role in calcium-regulated exocytosis. Hence, the functional implication of annexin 2 in exocytosis remains a controversial issue, because a peptide competing for the interaction of annexin 2 with p11 has no effect on secretion in permeabilized chromaffin cells (Ali and Burgoyne, 1990), although it significantly reduced Ca<sup>2+</sup>-triggered exocytotic membrane incorporation in endothelial cells (Konig *et al.*, 1998). Moreover, expression of a chimeric protein that leads to the formation of cytosolic annexin 2 aggregates does not affect secretion in PC12 cells, another argument against the participation of annexin 2 in exocytosis (Graham *et al.*, 1997).

In the present study, using a variety of direct means, we have revisited the role of annexin 2 in calcium-regulated exocytosis. Using chromaffin cells deficient in endogenous annexin 2, we demonstrate that the presence of annexin 2 at the cell periphery is a prerequisite for the docking and subsequent fusion of secretory granules with the plasma

This article was published online ahead of print in *MBC in Press* (<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E04-07-0627>) on January 5, 2005.

Address correspondence to: Sylvette Chasserot-Golaz (chasserot@neurochem.u-strasbg.fr).

membrane. Our results suggest that the translocation of annexin 2 to the plasma membrane favors the formation of lipid microdomains that are required for granule exocytosis.

## MATERIALS AND METHODS

### Chromaffin Cells and [<sup>3</sup>H]Noradrenaline Release

Chromaffin cells were isolated from fresh bovine adrenal glands by retrograde perfusion with collagenase, purified on self-generating Percoll gradients, and maintained in culture as described previously (Bader *et al.*, 1986). Catecholamine stores were labeled by incubation of cultured chromaffin cells with [<sup>3</sup>H]noradrenaline (13.3 Ci/mmol; Amersham Biosciences, Les Ulis, France) for 45 min. To trigger exocytosis, chromaffin cells were washed twice with Locke's solution (140 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 11 mM glucose, 0.56 mM ascorbic acid, and 15 mM HEPES, pH 7.2) and then stimulated 5 min with Locke's solution containing either 10 μM nicotine or 59 mM K<sup>+</sup> (made by decreasing NaCl isosmotically). Permeabilization of chromaffin cells with streptolysin-O (SLO; Institut Pasteur, Paris, France) was performed as described previously (Sarafian *et al.*, 1991). Briefly, cells were washed with calcium-free Locke's solution (containing 1 mM EGTA) and then permeabilized for 2 min at 37°C with streptolysin-O (18 U/ml) in 200 μl of calcium-free permeabilizing medium (150 mM glutamate, potassium salt, 10 mM PIPES, 5 mM nitrilotriacetic acid [NTA], 0.5 mM EGTA, 0.2% bovine serum albumin [BSA], 5 mM Mg-ATP, and 4.5 mM magnesium). Secretion was induced for 5 min with permeabilizing media containing 50 μM free calcium concentration. [<sup>3</sup>H]Noradrenaline release after stimulation was determined by measuring the radioactivity present in the incubation medium and in cells after precipitation with 10% (wt/vol) trichloroacetic acid (TCA). The amount of released [<sup>3</sup>H]noradrenaline is expressed as a percentage of total radioactivity present in the cells before stimulation.

### Construction and Expression of Viral Vectors

Construction of pSFV1EGFPsubX was described previously (Knight, 1999). The first (natural) promoter is followed by enhanced green fluorescent protein (EGFP) and the second pSFV1 internal promoter by BamHI and SmaI cloning sites. For sense and antisense constructs, the fragment 9–970 of annexin 2 was ligated in-frame in sense and antisense orientation into BamHI- and SmaI-digested pSFV1EGFPsubX. The chimeric XM construct corresponding to the 54 first base of annexin 2 fused to the entire p11 sequence was generated as described previously (Harder and Gerke, 1993; Harder *et al.*, 1993). The recombinant viral vectors and the SFV Helper 2 vector were linearized with SphI, transcribed, and transfected into 10<sup>7</sup> baby hamster kidney (BHK) cells essentially as described previously (Liljestrom and Garoff, 1991). After 24 h, the virus was harvested, concentrated by centrifugation on sucrose gradient, and suspended in OptiMEM containing 0.2% fetal calf serum (FCS). The viral stocks were aliquoted and stored at –80°C. Helper 2-packaged recombinant viruses were activated by α-chymotrypsin digestion (1/20) for 30 min at room temperature, followed by aprotinin inactivation of α-chymotrypsin. The titer of viral stocks was determined by infecting BHK cells and counting the number of cells expressing GFP, under conditions of single virus infection (i.e., <10% of BHK cells infected). The titer of the viral stocks was typically in the order of 10<sup>7</sup> infectious units. Chromaffin cells on coated glass coverslips in 24-well plates were routinely infected in 0.4 ml of OptiMEM containing 0.2% FCS and cells on 3-cm plates with 1 ml of solution containing 10 infectious units per cell. Cells were used for functional studies between 24 and 48 h after infection to detect EGFP-expressing cells.

### Electrochemical Measurement of Catecholamine Secretion from Single Chromaffin Cells

Cells cultured on 35-mm plates at a density of 7.5 × 10<sup>5</sup> cells/plate were washed with ascorbate-free Locke's solution and placed on the stage of an inverted microscope. A carbon fiber electrode was positioned in tangent contact with a single chromaffin cell by using a three-dimensional micromanipulator (Narishige, Tokyo, Japan). Catecholamine secretion was evoked by applying nicotine (100 μM) in ascorbate-free Locke's solution for 5 s to single cells by means of a glass micropipette (Femtotips; Eppendorf, Hamburg, Germany), and the amperometric response was measured as described previously (Vitale *et al.*, 2001). The amplitude of secretion was quantified by measuring the area below the current curve by using the MacLab system.

### Immunoblotting, Immunofluorescence, and Confocal Microscopy

One-dimensional SDS-gel electrophoresis was performed on 10% acrylamide gels in Tris-glycine buffer. The proteins were transferred to nitro-

cellulose sheets at a constant current of 120 mA for 1 h. Blots were developed using secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (HRP) (Amersham Biosciences), and the immunoreactive bands were detected using the enhanced chemiluminescence (ECL) system (Amersham Biosciences). For immunocytochemistry, chromaffin cells on coated glass coverslips were fixed as described previously (Chasserot-Golaz *et al.*, 1996). GM1 labeling was performed on live chromaffin cells incubated 5 min with 8 μg/ml fluorescent cholera toxin B subunit (coupled with Alexa 488 or Alexa 598; Molecular Probes, Eugene, OR) in Locke's solution with or without 10 μM nicotine. Cells were then processed for immunofluorescence labeling (Chasserot-Golaz *et al.*, 1996). The transient accessibility of dopamine β-hydroxylase (DBH) on the plasma membrane of stimulated chromaffin cells was tested by incubating cells for 5 min in Locke's solution containing 10 μM nicotine in the presence of anti-DBH antibodies diluted to 1:50. Staining for F-actin was performed with tetramethylrhodamine B isothiocyanate-conjugated phalloidin (0.5 μg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 15 min in the dark at room temperature.

Stained cells were visualized using a Zeiss confocal microscope LSM 510. Using the Zeiss CLSM instrument software 2.8, the amount of cholera toxin associated with the plasma membrane or the amount of phalloidin detected in the cell was measured and expressed as the average fluorescence intensity normalized to the corresponding surface area and divided by the total surface of each cell. This allows a quantitative cell-to-cell comparison of the fluorescence detected in cells.

### Antibodies

Rabbit polyclonal antibodies raised against annexin 2 (p36) purified from bovine aorta were used at 1:200 dilution (generous gift from J. C. Cavadore, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U-249, Montpellier, France). Mouse monoclonal antibodies against XM (H21) were used at a 1:5 dilution (Osborn *et al.*, 1988; Harder and Gerke, 1993). Mouse monoclonal antibodies against p11 were used at a 1:50 dilution (BD Transduction Laboratories Lexington, KY). Rat polyclonal antibodies against DBH (EC.1.14.17.1) were used at a 1:50 dilution to specifically label secretory granules in chromaffin cells (Pollard *et al.*, 1982; Perrin and Aunis, 1985). Rabbit polyclonal anti-chromogranin A antibodies were prepared in our laboratory (Ehrhart *et al.*, 1986) and used at a 1:2000 dilution. Mouse monoclonal antibodies anti-synaptotagmine (mAb1D12) were used at a 1:200 dilution (generous gift from Dr. M Takahashi, Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences, Machida, Tokyo, Japan). Monoclonal anti-SNAP-25 antibodies were used at a 1:5000 dilution (Sternberger Monoclonals, Lutherville, MD). Mouse monoclonal antibodies anti-flotillin were used at a 1:500 dilution (BD Transduction Laboratories Lexington). Mouse monoclonal antibodies anti-transferrin receptor was used at a 1:1000 dilution (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA). Cy2-anti-mouse, Cy3-anti-rabbit, and Cy5-anti-mouse were obtained from Amersham Biosciences.

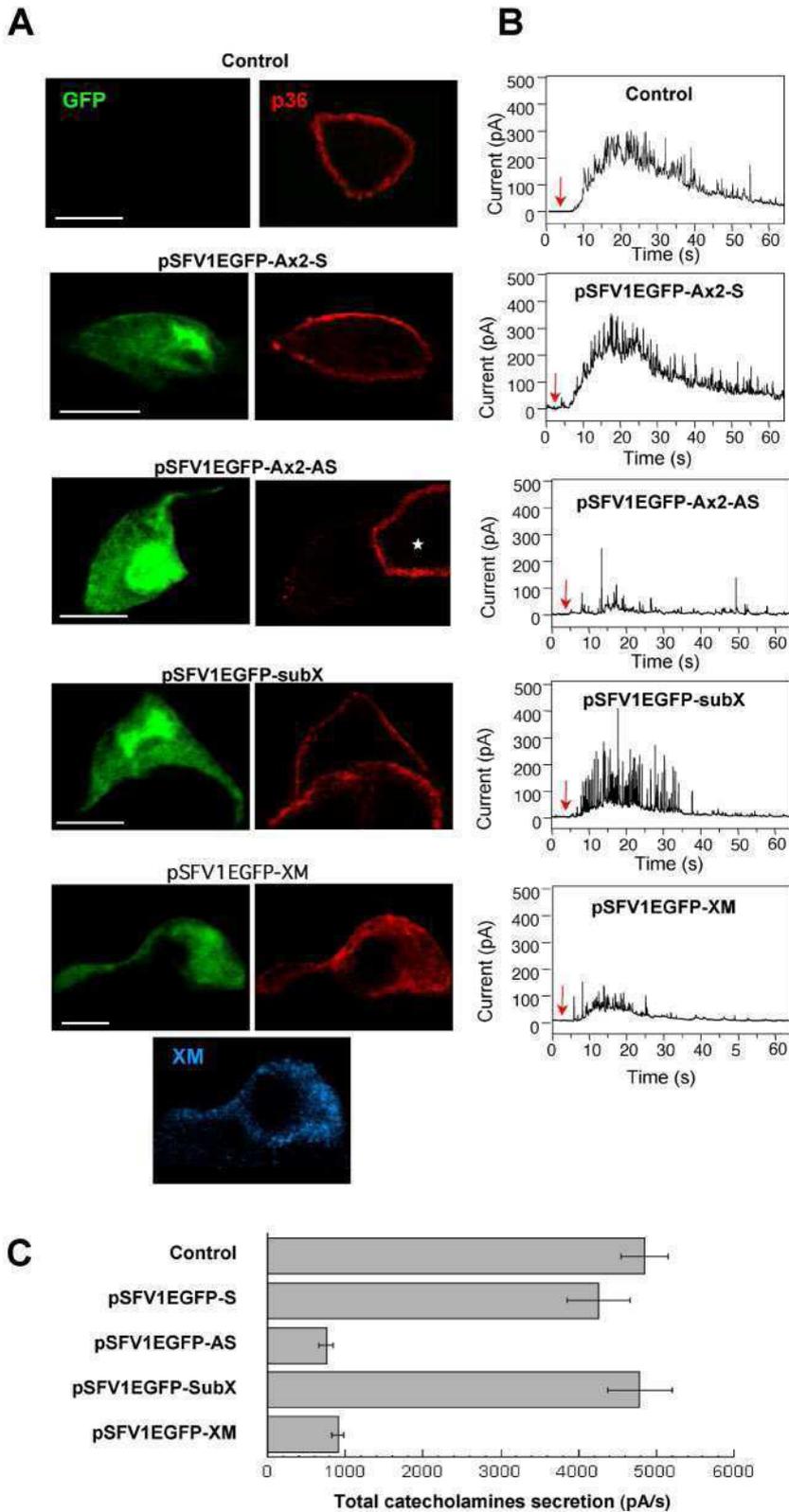
### Subcellular Fractionation

For subcellular fractionation, cultured chromaffin cells were collected and homogenized in 0.32 M sucrose, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, and then centrifuged at 800 × g for 15 min. The supernatant (cell lysate) was further centrifuged at 20 000 × g for 20 min. The 20,000-g pellet containing the crude membrane fraction was resuspended in sucrose 0.32 M (10 mM Tris-HCl, pH 7.4), layered on a continuous sucrose density gradient (1–2.2 M sucrose, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4), and centrifuged for 90 min at 100,000 × g. Twelve 1-ml fractions were collected from the top to the bottom and analyzed for protein content by the Bradford procedure. The distribution of SNAP-25 (plasma membrane marker) and chromogranin A (chromaffin granule marker) was estimated in fractions 2–12 (40 μg of protein per fraction) by SDS-PAGE and immunoblotting. GM1 was detected in the cell lysate (Ly), the crude membrane fraction (CM), in fractions 2–3 containing plasma membranes (PMs) and in fractions 8–10 containing chromaffin granules (GMs). Two microliters of each of these fractions prepared from resting and nicotine-stimulated cells was dot blotted onto nitrocellulose filter strips, incubated with HRP-conjugated cholera toxin (10 ng/ml; Sigma-Aldrich), and visualized by ECL.

In some experiments, chromaffin cells were stimulated for 10 min with nicotine and then rapidly scrapped in 2 ml of 150 mM glutamate, potassium salt, 10 mM PIPES, pH 7.2, 5 mM NTA, 0.5 mM EGTA, 0.2% BSA, 5 mM Mg-ATP, 4.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 mM CaCl<sub>2</sub>, and centrifuged for 15 min at 100,000 × g. The pellet containing the crude membranes was homogenized in 500 μl of the same buffer with or without 30 μM filipin, further incubated for 30 min at 0°C, and then centrifuged for 15 min at 100,000 × g. Pellets and supernatants were solubilized in SDS-sample buffer, and the presence of p36 and p11 proteins was analyzed by electrophoresis and immunoblotting.

### Flotation Gradient

Chromaffin cells on 10-cm dishes (5 × 10<sup>6</sup> cells) were washed in Locke's solution and stimulated with 10 μM nicotine for 10 min. Cells were lysed in 300 μl of TNE (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1



**Figure 1.** Reduction of peripheral annexin 2 alters the exocytotic release of catecholamines in chromaffin cells. Chromaffin cells were infected with the following vectors: pSFV1EGFP-Ax2-S, a control vector containing the sense sequence of p36; pSFV1EGFP-Ax2-AS, a vector containing the antisense sequence of p36; pSFV1EGFP-XM, a vector expressing the dominant negative p36/p11 chimera XM; and pSFV1EGFP-SubX, the empty vector. To facilitate identification of the infected cells, the viruses coexpressed EGFP. Forty-eight hours after infection, cells were stimulated with 10  $\mu$ M nicotine in Locke's solution, fixed, and immunostained with anti-p36 antibody. The XM chimeric protein was detected with the H21 monoclonal antibody (note that the anti-p36 antibody does not recognize the XM chimeric protein). (A) Confocal micrographs (bars, 10  $\mu$ m). (B) Catecholamine release estimated by amperometry. The traces shown are typical responses to a local application of 100  $\mu$ M nicotine for 5 s (arrow). (C) Amperometric responses were integrated to obtain the total catecholamine secretion expressed in pA per second. Data are the means of 25 cells/group from the same dish  $\pm$  SEM. Similar results were obtained in three independent experiments performed on two culture preparations and infected with different batches of recombinant virus.

mM dithiothreitol, and CLAP protease inhibitor cocktail), 10% sucrose, and 1% Triton X-100 at 4°C. The cell pellet was resuspended and further incubated for 30 min on ice. Then, 600  $\mu$ l of cold 60% Optiprep (Nycomed-Pharma, Oslo, Norway) was added to the extract, and the mix was transferred to a SW60 centrifuge tube (Beckman, Munich, Germany). The sam-

ple was overlaid with 900- $\mu$ l step of each of 35, 30, 25, and 5% Optiprep in TNE, 1% Triton X-100. The gradients were spun for 17 h at 34,000 rpm at 4°C. Ten fractions from the top of the gradient were collected. The fractions were TCA precipitated and analyzed by Western blot with anti-p36, anti-p11, or anti-synaptotagmin antibodies followed by HRP-coupled sec-

**Table 1.** Analysis of amperometric spikes from infected chromaffin cells

	pSFV1EGFP-Ax2S	pSFV1EGFP-Ax2AS	pSFV1EGFP-SubX	pSFV1EGFP-XM
Total cell recorded	36	32	37	30
Total number of spike	1382	224	1299	182
No. of spike/cell	38±3	7±1	35±3	6±2
Rise-time (ms)	7.4±0.5	7.2±0.6	6.9±0.4	7.1±0.4
Fall-time (ms)	17±1.1	15.3±1.5	16.2±1.2	14.9±1.6
Half width (ms)	8.9±0.6	9.1±0.3	9.2±0.5	8.7±0.3
Ave. height (pA)	148±16	138±21	156±19	143±14
Total charge/spike (pC)	1.56±0.16	1.48±0.20	1.68±0.13	1.60±0.18

Amperometric responses were recorded on an expanded time base to avoid overlapping of the spikes. Spikes were only analyzed if they had a base width >10 ms and an amplitude >40 pA. In this way, analyzes were confined to spikes arising immediately beneath the carbon fiber to limit effects on the data of catecholamine diffusion from distant release sites. Spike characteristics were obtained through analysis of amperometric recordings by using Scope version 3.3 software.

ondary antibodies (Bio-Rad, Hercules, CA) and ECL (Amersham Buchler, Braunschweig, Germany). GM1 was detected as described above.

## RESULTS

### *Reduction of Subplasmalemmal Annexin 2 Inhibits Exocytosis in Chromaffin Cells*

To probe the role of annexin 2 (p36) in exocytosis, we modified the expression level of endogenous annexin 2 in chromaffin cells by using the Semliki Forest virus expression system (Knight, 1999). Two types of recombinant virus were constructed: pSFV1EGFP-Ax2-AS, expressing the antisense sequence of p36 (annexin 2) to decrease levels of the endogenous protein, and pSFV1EGFP-XM, which expressed a p36/p11 chimera (XM) that aggregates cytosolic p36 and prevents the formation of the annexin 2 tetramers (Harder and Gerke, 1993; Harder *et al.*, 1993). To identify infected cells, the EGFP marker was included in the viruses under the control of a second promoter. In control cells and cells infected with either an empty vector (subX) or a vector containing the p36 sense sequence (Ax2-S), secretagogue-evoked stimulation triggered the translocation of annexin 2 to the subplasmalemmal region (Figure 1A). Exocytotic capacity, as measured in parallel by using amperometry to resolve the frequency and kinetics of individual secretory granule release events, was unchanged by p36 sense expression (Figure 1B). Amperometric signals were characterized by a rapid increase in the oxidation current for generally 15–20 s and numerous sharp spikes reflecting the release of the contents of single secretory granules. In contrast, cells infected with the p36 antisense virus (Ax2-AS) exhibited an 80% reduction in the level of endogenous p36 as estimated by quantifying the fluorescence intensity (Figure 1A) and a 75% decrease in exocytotic activity (Figure 1, B and C). Similarly, sequestration of endogenous p36 into cytosolic aggregates by infection with pSFV1EGFP-XM strongly reduced the exocytotic response (Figure 1).

A more detailed amperometric analysis was undertaken on clearly defined spikes recorded at a higher resolution. Expression of p36 antisense or XM markedly decreased the number of nicotine-evoked individual exocytotic events (spikes) compared with control cells (Table 1). We examined the spike characteristics that provide information about the kinetics of fusion pore formation, expansion, and closure (Albillos *et al.*, 1997; Burgoyne and Barclay, 2002). The amplitude (average height) and total charge carried by the residual spikes in infected chromaffin cells with reduced subplasmalemmal p36 were not decreased compared with

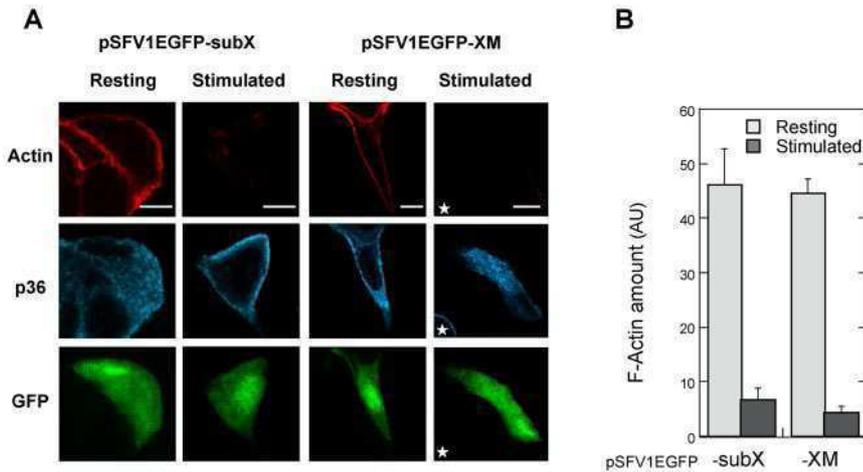
noninfected control cells (Table 1), indicating that the reduction in secretion was not caused by depletion of granule catecholamine. Similarly, the overall shape of the spikes (rise time and fall time) and the mean values for the half-widths of the spikes were not affected (Table 1). Thus, inhibition of p36 translocation to the plasma membrane affects the number but not the kinetics of the single granule release events detected as amperometric spikes. This suggests that annexin 2 at the plasma membrane might be required for the recruitment and/or docking of secretory granules to sites of exocytosis rather than for the fusion event itself.

### *Peripheral Annexin 2 Is Not Involved in the Actin Depolymerization Preceding Exocytosis*

In chromaffin cells, actin filaments are concentrated under the plasma membrane. This actin network forms a barrier that prevents the docking of chromaffin granules to the plasma membrane. Stimulation triggers the reorganization of actin and partial removal of the barrier (Cheek and Burgoyne, 1986; Aunis and Bader, 1988; Sontag *et al.*, 1988; Vitale *et al.*, 1995), and these actin filament rearrangements are required for exocytosis. Because annexin 2 is an actin-binding protein, we investigated whether the reduction in peripheral p36 might affect this event. Therefore, actin filaments (F-actin) were visualized by rhodamine-phalloidin staining in cells transiently overexpressing the XM mutant. In resting chromaffin cells infected with control or XM-expressing virus, actin filaments localized to the cell periphery, in the form of a continuous cortical ring (Figure 2A). Stimulation with nicotine decreased the amount of F-actin detected in control and pSFV1EGFP-XM-infected cells by 84 and 89%, respectively (Figure 2, A and B), indicating that cortical actin similarly disassembled despite the blockade of p36 translocation in cells expressing XM. Thus, the presence of annexin 2 in the subplasmalemmal region is not a prerequisite for the actin depolymerization that necessarily precedes the recruitment and docking of secretory granules to the plasma membrane.

### *Secretagogue-Evoked Stimulation Triggers the Appearance of Lipid Rafts at the Sites of Exocytosis*

Annexin 2 has been recently described as a calcium-dependent promoter of lipid raft microdomains in membranes (Babiychuk and Draeger, 2000; Babiychuk *et al.*, 2002; Mayran *et al.*, 2003). Because lipid rafts may be important for exocytosis (Lang *et al.*, 2001; Salaun *et al.*, 2004), we have studied their formation in stimulated chromaffin cells. To



**Figure 2.** Expression of the XM chimera blocks the translocation of annexin 2 but does not modify the actin depolymerization required for exocytosis. Chromaffin cells infected with pSFV1EGFP-subX or pSFV1EGFP-XM were maintained under resting conditions or stimulated for 5 min with 10  $\mu$ M nicotine and then processed for immunocytochemistry. Cells were double labeled with anti-p36 antibodies and rhodamine-conjugated phalloidin. Images were recorded in the same optical section by a triple exposure procedure. Bars, 10  $\mu$ m. The star indicates a noninfected cell. (B) The histogram represents a semiquantitative analysis of the amount of fluorescent phalloidin detected in resting and nicotine-stimulated cells ( $\pm$ SEM,  $n = 13$ ). Actin was found to depolymerize similarly in infected cells in which p36 translocation was impaired in comparison with noninfected cells that had p36 in the periphery.

monitor in parallel the exocytotic activity and the formation of rafts at the plasma membrane, we used an immunofluorescent approach. Exocytosis was visualized in living cells by adding anti-DBH antibodies into the incubation medium (Chasserot-Golaz *et al.*, 1996). The granule-associated DBH becomes accessible to the antibody only at sites of exocytosis, leading to the appearance of fluorescent patches at the cell surface. In parallel, GM1-containing rafts were visualized using fluorescent cholera toxin (Harder *et al.*, 1998; Janes *et al.*, 1999). As illustrated in Figure 3A, resting chromaffin cells exhibited no DBH patches, confirming the low levels of baseline exocytotic activity in the absence of secretagogue, and displayed only a faint staining with cholera toxin at the cell surface. Stimulation with nicotine for 5 min triggered the appearance of a patchy pattern of DBH surface staining and concomitantly increased the binding of fluorescent cholera toxin (Figure 3A, S1). Note the colocalization between DBH and cholera toxin at the cell surface (Figure 3A, mask), indicating that the GM1-enriched microdomains correspond to the sites of exocytosis. Cholera toxin binding was similarly observed when stimulated cells were fixed before incubation with the toxin, excluding the possibility that GM1 clustering was caused by the toxin itself (Figure 3A, S2). As observed at higher magnification by differential interference contrast (DIC) imaging, the cell membrane remained uniform upon cell stimulation indicating that patches of cholera toxin were not due to morphological heterogeneity of the cell surface (Figure 3B).

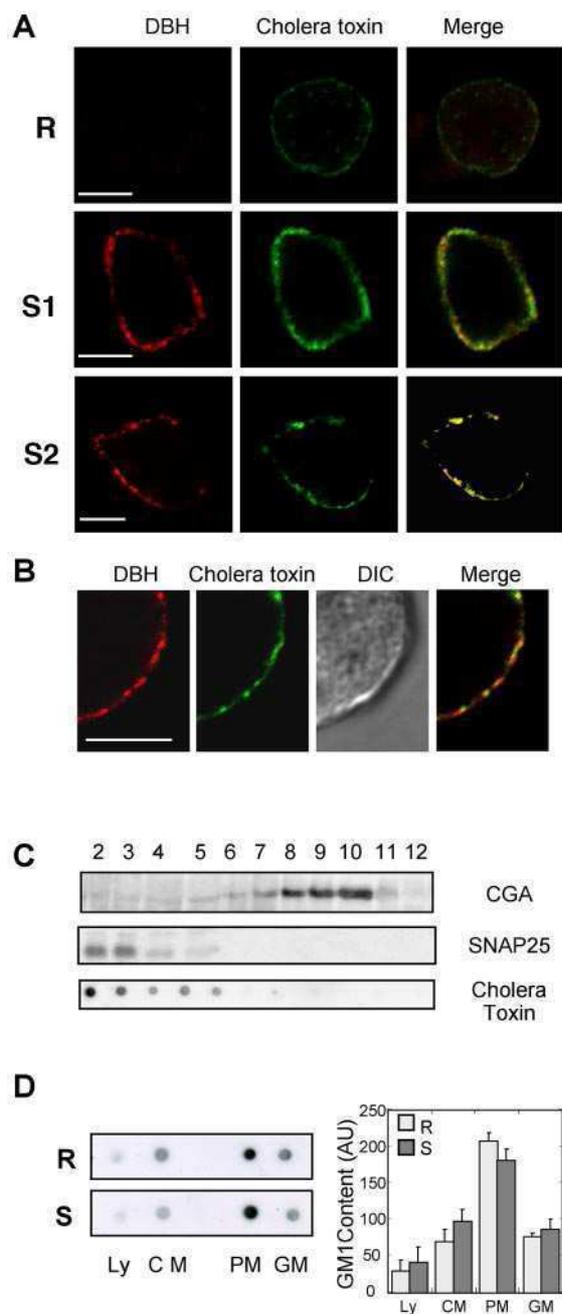
To assess whether the increase in cholera toxin labeling resulted from a de novo synthesis of GM1 during the period of stimulation, we compared the amount of GM1 present in fractions collected from a continuous sucrose density gradient layered with crude membranes prepared from resting or stimulated cells. The amount of GM1 was determined by dot blot by using peroxidase-conjugated cholera toxin. As illustrated in Figure 3C, GM1 was essentially detected in fractions 2–3 containing the plasma membranes as assessed by following the distribution of SNAP-25. GM1 was not detected in the fractions containing secretory granules marked by chromogranin A (CGA). In addition, we found neither significant increase in the total cellular amount of GM1 nor increased level in plasma membranes prepared from resting or stimulated cells (Figure 3D). Thus, cell surface increase of cholera toxin labeling observed in stimulated cells was not due to the insertion of granule membranes into the plasma membrane by exocytosis or to the synthesis of GM1 during the period of stimulation. More likely, cholera toxin labeling

resulted from the coalescence of small lipid microdomains into larger units. These larger rafts were either more easily detectable at the light microscopic level or they bound cholera toxin with an increased affinity due to multivalency effects given by the aggregated GM1 molecules (Arosio *et al.*, 2004).

#### *Annexin 2 Is Associated with Secretagogue-induced Lipid Rafts in Chromaffin Cells*

To investigate whether annexin 2 is present in the lipid rafts formed during exocytosis, we performed a triple labeling experiment by using anti-p36 and anti-p11 antibodies together with fluorescent cholera toxin. As illustrated in Figure 4A, areas of colocalization between p36, p11, and the cholera toxin-binding sites occurred in nicotine-stimulated cells after translocation of the cytosolic p36 to the subplasmalemmal region. This suggests that the annexin 2 tetramers formed at the plasma membrane upon cell stimulation (Chasserot-Golaz *et al.*, 1996) preferentially associate to the GM1-containing microdomains. The presence of annexin 2 tetramers in the secretagogue-induced lipid rafts was further confirmed by subcellular fractionation. Rafts or detergent-resistant membranes (DRMs) can be isolated on the basis of their relative insolubility in Triton X-100. Resting and nicotine-stimulated chromaffin cells were solubilized in Triton X-100 and then centrifuged in a 5–35% Optiprep gradient to segregate the low-density rafts/DRMs (Harder *et al.*, 1998). After centrifugation, the distribution of GM1 on the gradient was determined by dot blot by using peroxidase-conjugated cholera toxin, whereas cosegregating proteins were identified by SDS-electrophoresis and immunoblotting. As expected, GM1 gangliosides floated in the 30% Optiprep fraction (Figure 4, B and C). Flotillin was enriched in the same fractions, whereas transferrin receptors, which are not associated to DRMs, were present in the bottom of the tube. Caveolin was not detected (our unpublished data), in agreement with previous studies reporting low levels of caveolae in PC12 cells (Bilderback *et al.*, 1999; Chamberlain *et al.*, 2001). The total amount of GM1 and flotillin was not significantly modified in the Triton X-100 homogenates prepared from resting and stimulated cells (our unpublished data). However, GM1 and flotillin were concentrated in the 30% Optiprep fractions in gradients prepared from stimulated cells (Figure 4, B and C), confirming the formation of detergent-insoluble rafts during the exocytotic process.

Both p36 and p11 shifted into the GM1- and flotillin-containing DRMs in stimulated cells, together with synap-



**Figure 3.** GM1-enriched microdomains colocalize to sites of exocytosis. (A) Chromaffin cells were maintained in the resting state (R) or stimulated 5 min with nicotine in the presence of anti-DBH antibodies (S1, S2). Cells were stimulated in the presence of Alexa-488 conjugated cholera toxin and then fixed (S1) or fixed before incubation with Alexa-488 conjugated cholera toxin (S2). DBH staining was revealed with Cy3-conjugated anti-rat antibodies. The weighted colocalization coefficient was  $\sim 0.77 \pm 0.02$  ( $\pm$ SEM,  $n = 9$ ). (B) Higher magnification images of a stimulated chromaffin cell double-labeled with DBH antibodies and cholera toxin and the corresponding DIC image. Bars, 5  $\mu$ m. (C) Fractions 2–12 (40  $\mu$ g of protein/fraction) collected from a continuous sucrose density gradient layered with the crude chromaffin membrane pellet were subjected to gel electrophoresis and immunodetection on nitrocellulose using anti-SNAP-25 (plasma membrane marker) and antichromogranin A (chromaffin granule marker) antibodies. To detect the ganglioside GM1, 2  $\mu$ l of each fraction was dot blotted onto nitrocellulose and incubated with HRP-conjugated cholera toxin.

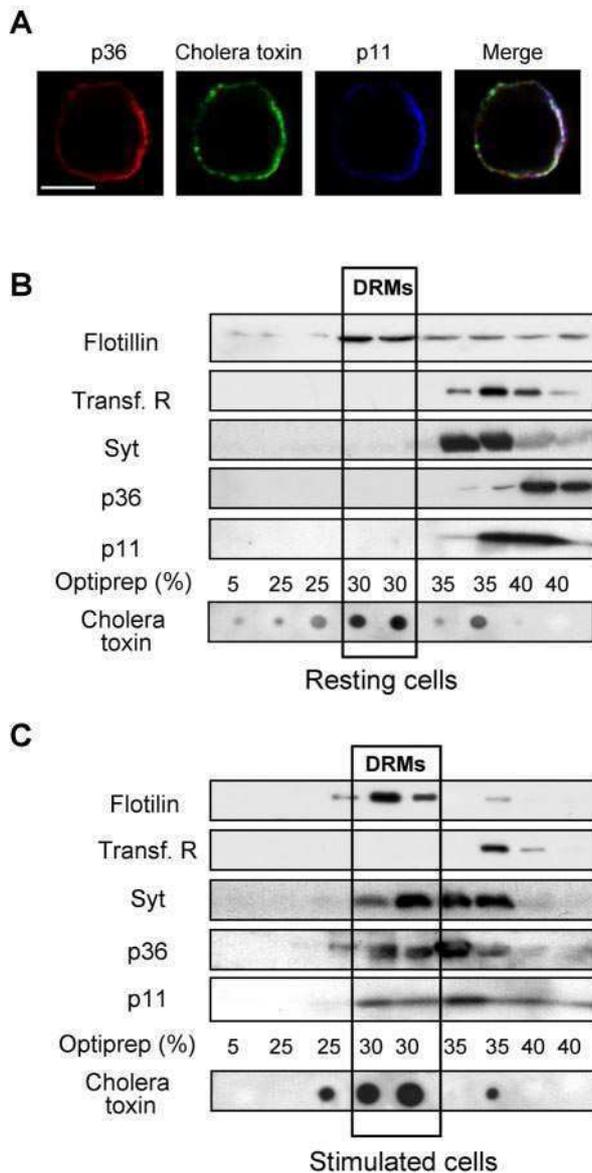
totagmin 1, a component of the exocytotic machinery known to be required for calcium-sensitive granule release in chromaffin cells (Voets *et al.*, 2001). Note that none of these proteins were detected in DRMs prepared from resting cells (Figure 4B), indicating that their recruitment to rafts is intimately linked to exocytotic stimulation. Together, these experiments indicate that secretagogue-evoked stimulation in chromaffin cells triggers the formation of lipid rafts at the plasma membrane which recruit annexin 2 tetramers together with elements of the docking/fusion machinery.

#### Secretagogue-induced Rafts Depend on Cholesterol

In the following experiments, we investigated whether the cholera toxin-binding sites to which annexin 2 translocates in stimulated cells represent cholesterol-dependent microdomains. Using a cholesterol-sequestering agent, the polyen antibiotic filipin, we first examined whether the membrane association of annexin 2 was sensitive to the cholesterol clustering agent. Crude membranes prepared from nicotine-stimulated chromaffin cells were treated with filipin, centrifuged, and the amount of p36 and p11 detected in the pellet or released in the supernatant was analyzed by immunodetection. As illustrated in Figure 5A, filipin treatment led to a partial solubilization of both p36 and p11, suggesting that cholesterol was to some extent required to stabilize the calcium-dependent binding of annexin 2 tetramer to the plasma membrane. Consistent with this observation, addition of cholesterol has been reported to increase the binding of monomeric and tetrameric forms of annexin 2 on liposomes (Ayala-Sanmartin *et al.*, 2001; Mayran *et al.*, 2003).

The effect of filipin on the distribution of p36 and p11 in resting and stimulated chromaffin cells is shown in Figure 5C. Chromaffin cells were exposed to 10  $\mu$ M filipin before stimulation with nicotine. By fluorescent microscopy, we verified that filipin remained at the plasma membrane and therefore should not disrupt intracellular compartments such as secretory granules (Figure 5B). Under these experimental conditions, filipin also had no apparent effect on cell integrity as judged by the intact peripheral actin cytoskeleton observed in resting cells (Figure 5C). Treatment with filipin clearly reduced the amount of cholera toxin bound in stimulated cells, indicating that the secretagogue-evoked GM1-enriched microdomains represent genuine cholesterol-dependent rafts (Figure 5C). Moreover, p36 remained in the cytosol in filipin-treated cells (Figure 5C), supporting the idea that cholesterol is required to maintain annexin 2 at the plasma membrane after secretagogue-induced translocation. Although cholesterol depletion did not affect the peripheral distribution of p11 in resting chromaffin cells, it did cause p11 to fall into the cytosol upon cell stimulation (Figure 5C). This suggests that the interactions that recruit p11 to the plasma membrane in resting cells no longer suffice in stimulated cells when cholesterol is depleted. Subcellular fractionation performed on filipin-treated cells confirmed that p11 and p36 no longer floated on Optiprep density gradients (Figure 5D), consistent with the immunocytochemical re-

(D) Resting or nicotine-stimulated chromaffin cells were lysed and processed for subcellular fractionation on sucrose gradients. Fractions corresponding to the Ly, CM, PM, and GM were probed for the presence of GM1 by using HRP-conjugated cholera toxin. Similar results were obtained in two independent fractionations performed with different cell cultures. The histogram represents a semiquantitative analysis of the cholera toxin binding detected in the different fractions under resting (R) and stimulating conditions (S). Data are given as the mean values  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ).



**Figure 4.** Annexin 2 is concentrated and recruited into rafts in stimulated chromaffin cells. (A) Chromaffin cells were stimulated 5 min with nicotine in the presence of cholera toxin, fixed, and double labeled with anti-p36 and anti-p11 antibodies. Images were recorded in the same optical section by a triple exposure procedure. The white pixels in the merge image correspond to the superimposition of red, green, and blue colors and reveal the areas of colocalization of p36 and p11 with the cholera toxin binding sites. The weighted colocalization coefficient is  $\sim 0.85 \pm 0.02$  ( $\pm$ SEM,  $n = 9$ ). Bars, 5  $\mu$ m. (B and C) Resting or nicotine-stimulated chromaffin cells were extracted by 1% Triton X-100 at 4°C and fractionated on an Optiprep density gradient. Each fraction was resolved on SDS-PAGE and analyzed by Western blot/ECL to detect flotillin, transferrin receptors, p36, p11, and synaptotagmin. GM1 ganglioside was detected by dot blot with HRP-conjugated cholera toxin and visualized by ECL. Low-density fractions contained rafts/DRMs, as judged by the presence of GM1 and flotillin. High-density fractions contained the bulk of solubilized membrane proteins such as transferrin receptors.

sults mentioned above indicating that the annexin 2 tetramers localize to cholesterol-dependent microdomains in stimulated cells. Together, these results lead us to conclude that secretagogue-evoked stimulation triggers the formation of

cholesterol-dependent rafts in the plasma membrane, which are required to stabilize p11, and most likely the annexin 2 tetramer, near sites of exocytosis in chromaffin cells.

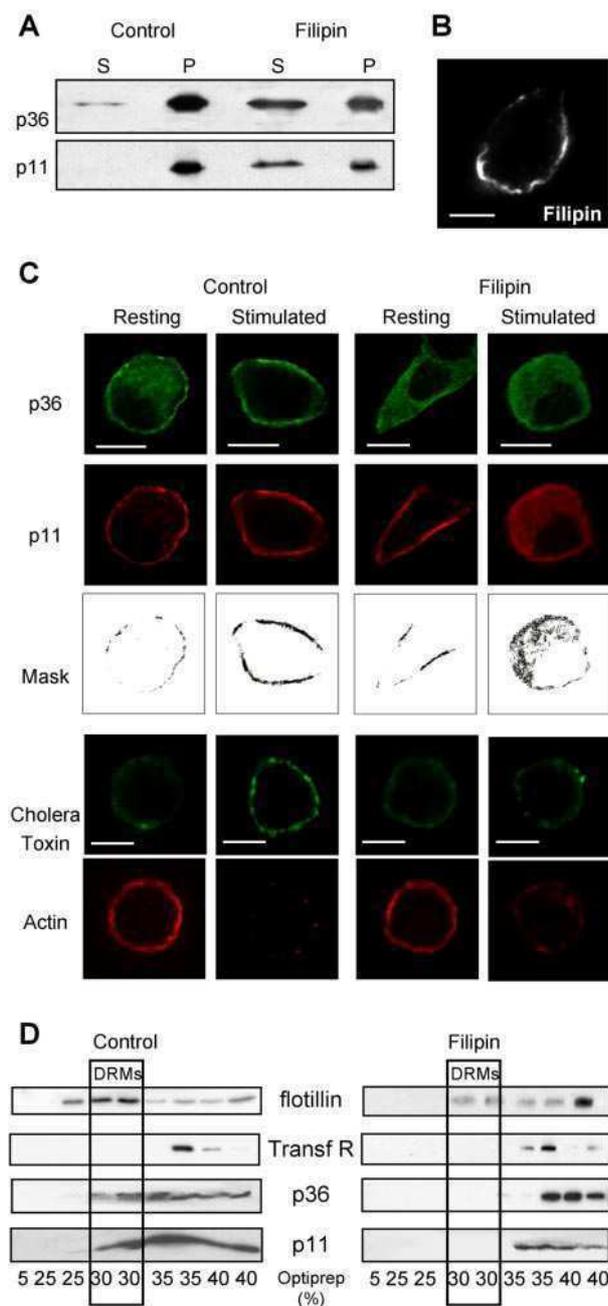
#### *Raft/DRMs Dispersion by Cholesterol Sequestration Is Associated with an Inhibition of Exocytosis*

To evaluate the functional importance of the secretagogue-evoked lipid rafts in exocytosis, chromaffin cells were treated with various concentrations of filipin and catecholamine secretion was evoked. Figure 6A shows that filipin induced a dose-dependent inhibition of secretion in response to nicotine or a depolarizing concentration of potassium. Moreover, because cholesterol-dependent DRMs have been suggested to be important for clustering and regulation of neurotransmitter receptors and ion channels (Tsui-Pierchala *et al.*, 2002), we also examined the effect of filipin on secretion from permeabilized chromaffin cells, to by-pass the nicotinic receptors and voltage-gated calcium channels. Filipin at 10  $\mu$ M inhibited to a similar extent calcium-evoked catecholamine release from permeabilized cells (Figure 6B), indicating that the formation of cholesterol-dependent DRMs is required at a step distal to the activation of receptors and mobilization of cytosolic calcium. To confirm that the effect of filipin on exocytosis was due to cholesterol sequestration, we measured the influence of cholesterol addition on catecholamine secretion (Figure 6C). Cholesterol partially reversed the inhibitory effect of filipin, in line with the idea that cholesterol-dependent microdomains are important for exocytosis.

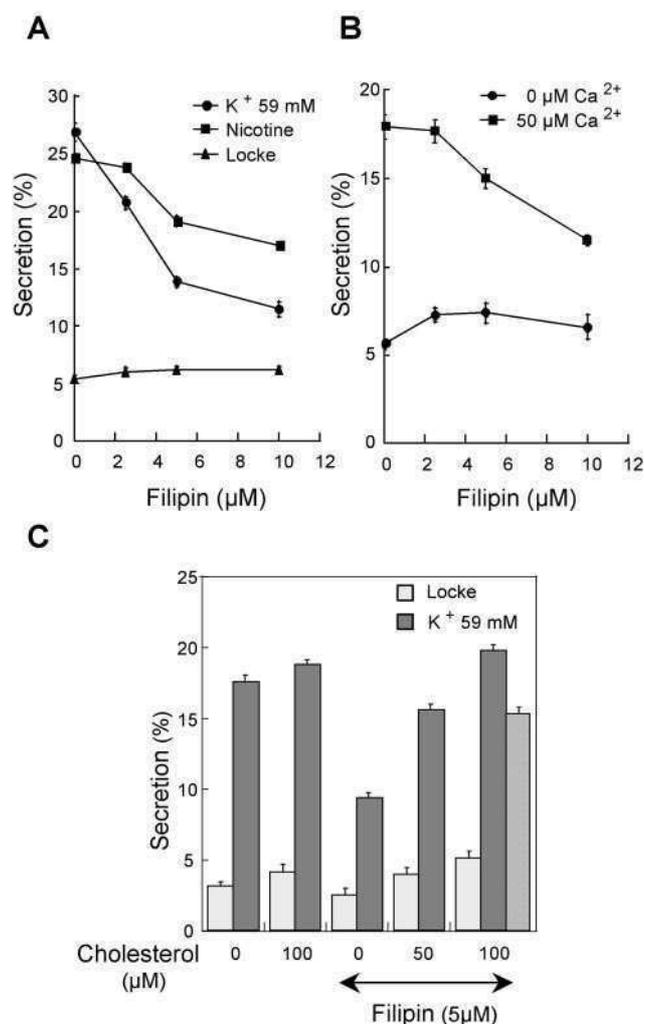
#### *Annexin 2 Participates in the Organization of Lipid Rafts during Exocytosis*

To probe the idea that annexin 2 contributes to the formation of lipid rafts in stimulated chromaffin cells, we first compared the time course of p36 translocation, raft formation, and catecholamine secretion in nicotine-stimulated chromaffin cells. As illustrated in Figure 7, the translocation of annexin 2 to the plasma membrane occurred as an early event in the exocytotic pathway that clearly preceded raft aggregation detected by cholera toxin labeling and [ $^3$ H]noradrenaline secretion.

We then used cells expressing the XM chimera in which the translocation of p36 was impaired. Virus-infected cells identified with EGFP were stimulated with nicotine in the presence of cholera toxin to visualize the formation of rafts, fixed, and then stained with anti-p36 antibodies. As expected, stimulation of cells infected with a control vector triggered the translocation of p36 to the cell periphery and the concomitant appearance of rafts at the plasma membrane (Figure 8). In contrast, in chromaffin cells expressing the XM construct, p36 remained aggregated in the cytosol, and very little cell surface binding of cholera toxin was detected (Figure 8A). Semiquantitative analysis performed on cells expressing XM, and on cells with reduced endogenous p36 due to infection with the p36 antisense virus, confirmed that the amount of cholera toxin associated with the plasma membrane was closely related to the presence of p36 in the cell periphery (Figure 8B). Thus, the formation of rafts in secretagogue-stimulated cells depends on the translocation of p36 to the plasma membrane, suggesting that annexin 2 tetramers actively participate in the formation and/or the stabilization of the GM1-containing microdomains required for exocytosis.



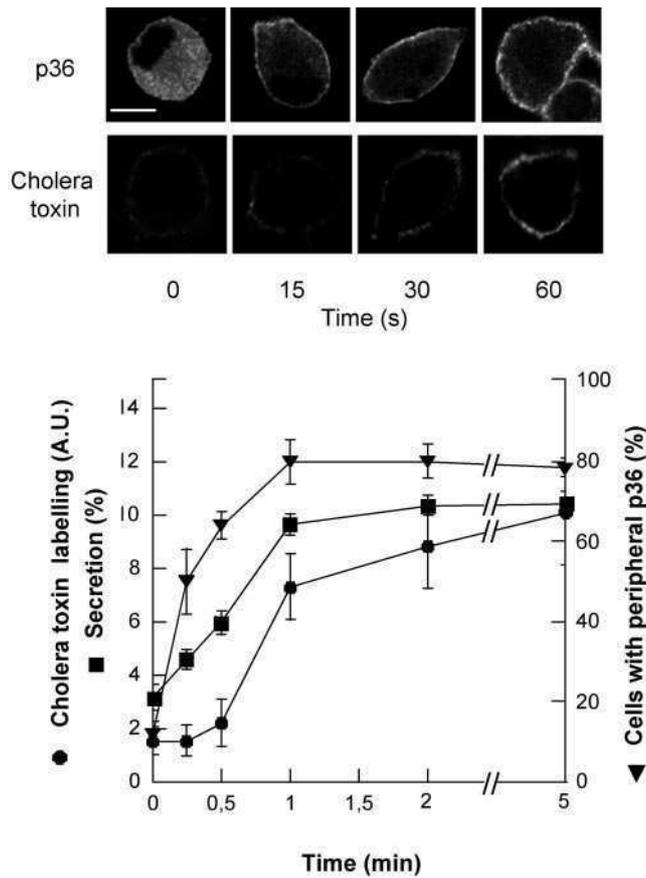
**Figure 5.** Filipin prevents the formation of annexin 2-containing rafts in stimulated cells. (A) Sequestration of cholesterol by filipin releases membrane-bound annexin 2. Crude membranes prepared from stimulated chromaffin cells were treated with filipin, centrifuged to separate the membrane-associated (P) from the soluble (S) proteins, and analyzed by SDS-PAGE and Western blot/ECL to detect p36 and p11. (B) Micrograph image of a chromaffin cell treated for 10 min with 10  $\mu$ M filipin, which is fluorescent at 525 nm after excitation at 360 nm. Bar, 5  $\mu$ m. (C) Confocal micrographs of chromaffin cells treated or not for 10 min with 10  $\mu$ M filipin and maintained under resting conditions or stimulated with 10  $\mu$ M nicotine. Cells were either double labeled with anti-p36 and anti-p11 antibodies or stimulated in the presence of cholera toxin and labeled with rhodamine-conjugated phalloidin. Masks representing the region of colocalization were generated by selecting the double-labeled pixels. Bar, 5  $\mu$ m. (D) Nicotine-stimulated chromaffin cells were incubated in the presence or absence of 5  $\mu$ M filipin, extracted by 1% Triton X-100 at 4°C with or without 5  $\mu$ M filipin, and then fractionated on an Optiprep density gradient. Fractions were resolved on SDS-PAGE and analyzed by Western blot/ECL to detect the indicated proteins.



**Figure 6.** Effect of filipin on [ $^3$ H]noradrenaline secretion in response to various secretagogues. (A) Chromaffin cells were incubated for 10 min in Locke's solution containing the indicated concentrations of filipin and then stimulated for 10 min with 10  $\mu$ M nicotine or 59 mM potassium. Basal release in the absence of stimulus (Locke) was recorded for 10 min. (B) Chromaffin cells incubated with the indicated concentrations of filipin were permeabilized and stimulated with 0 or 50  $\mu$ M free calcium. (C) Chromaffin cells were incubated for 10 min in Locke's solution containing 5  $\mu$ M filipin and the indicated concentrations of cholesterol. Hatched bar, cells were first exposed for 5 min to 5  $\mu$ M filipin and then incubated for 10 min with 59 mM potassium. Extracellular fluids were collected and the radioactivity present in solutions and cells was assayed. Data are given as the mean of triplicate determinations on the same cell preparation. Similar results were obtained with three different cell preparations.

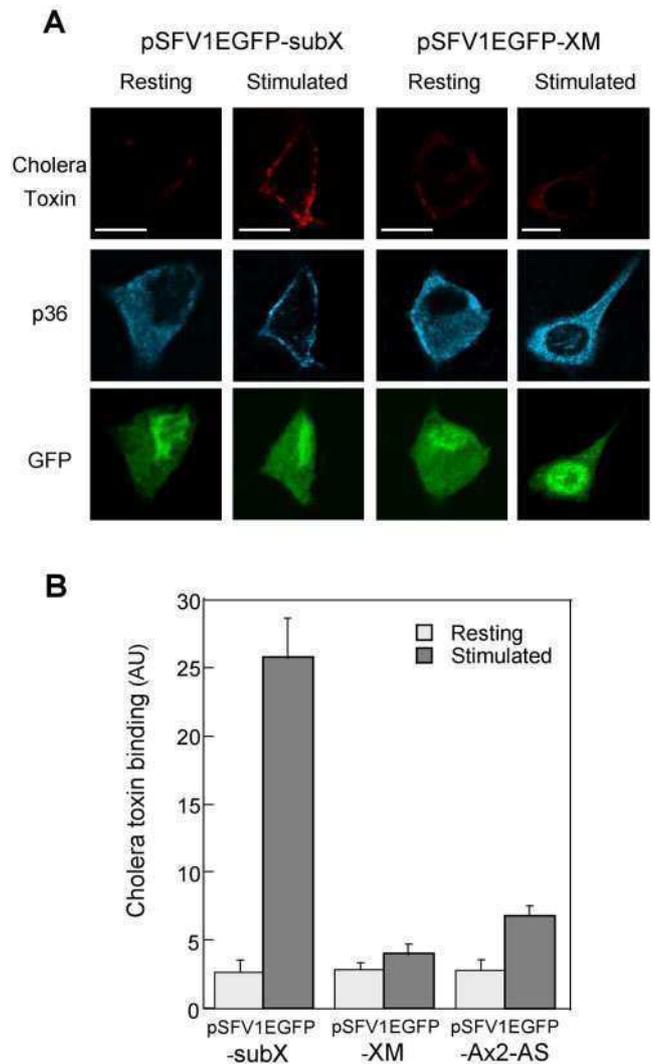
## DISCUSSION

We previously studied the distribution of annexin 2 (p36) and its cellular ligand p11 in chromaffin cells and found that p36 is located throughout the cytoplasm, whereas p11 is present exclusively in the subplasmalemmal region (Chasserot-Golaz *et al.*, 1996). Secretagogue-evoked stimulation triggered the colocalization of p36 and p11 underneath the plasma membrane and the formation of the annexin 2 heterotetramer (p90) near exocytotic sites. Microinjection of a



**Figure 7.** Time course of annexin 2 translocation, raft formation and [<sup>3</sup>H]noradrenaline secretion in nicotine-stimulated chromaffin cells. Chromaffin cells labeled with [<sup>3</sup>H]noradrenaline were stimulated with 10 μM nicotine for the indicated periods of time. Extracellular fluids were then collected and the radioactivity present in solutions and in cells was measured. Data are given as the mean of triplicate determinations. In parallel, nicotine-stimulated chromaffin cells were fixed and labeled with cholera toxin or anti-p36 antibodies. The percentage of cells displaying a peripheral labeling of p36 was estimated by counting cells on randomly selected areas. Raft formation was assessed by a semiquantitative analysis of the cell surface cholera toxin binding and expressed as arbitrary units (±SEM; n = 10).

peptide that competes for the phosphorylation of annexin 2 by protein kinase C (PKC) prevented the translocation of annexin 2 and inhibited exocytosis (Chasserot-Golaz *et al.*, 1996). This suggested that the presence of annexin 2 at the plasma membrane is required for exocytosis, although we could not exclude a direct inhibition of PKC activity in the microinjected cells. In this study, we attempted to obtain more direct evidence for the involvement of annexin 2 in calcium-regulated exocytosis. Using the Semliki Forest virus expression system, we show that expression of an antisense annexin 2 RNA decreases the synthesis of endogenous annexin 2, most probably by forming double-stranded RNA with the endogenous mRNA. This resulted in a marked inhibition of catecholamine secretion from chromaffin cells. Moreover, expression of the chimeric XM protein corresponding to p11 fused C-terminally to the first 18 residues of annexin 2 also produced a strong inhibition of chromaffin cell secretion. In Madin-Darby canine kidney cells, XM causes the aggregation of endogenous annexin 2 and p11



**Figure 8.** Reduction of peripheral annexin 2 inhibits raft formation in stimulated chromaffin cells. (A) Chromaffin cells infected with pSFV1EGFP-SubX or pSFV1EGFP-XM were maintained under resting conditions or stimulated with 10 μM nicotine in the presence of cholera toxin to visualize rafts. Cells were subsequently fixed and stained with anti-p36 antibodies. Confocal images were recorded in the same optical section by a triple exposure procedure. Bars, 5 μm. (B) Semiquantitative analysis of the binding of cholera toxin to the plasma membrane in resting and stimulated chromaffin cells infected with pSFV1EGFP-SubX, pSFV1EGFP-XM, or pSFV1EGFP-AS expressed as arbitrary units (±SEM; n = 10).

(Harder and Gerke, 1993; Harder *et al.*, 1993). Similarly, in chromaffin cells, XM formed cytosolic aggregates that prevented the translocation of cytosolic p36 to the plasma membrane upon cell stimulation. Together, these results indicate that exocytosis is strongly inhibited when the formation of the annexin 2 tetramer at the plasma membrane is impaired by a reduction of functional p36. To our knowledge, this is the first direct demonstration of a functional role for annexin 2 in dense-core granule exocytosis, by using molecular tools in living cells. It should be mentioned that our results are in contrast to those of a previous study reporting that XM expression in stably transfected PC12 cell lines does not affect Ca<sup>2+</sup>-dependent secretion (Graham *et al.*, 1997). However, stable XM expression resulted in an increase in the

expression of endogenous annexin 2, and it cannot be ruled out that the endogenous nonaggregated pool of annexin 2 simply remained sufficient to maintain exocytotic activity in this cell line.

Despite 20 years of extensive study, the precise function of most of the annexins remains to be elucidated. Regulated exocytosis in neuroendocrine cells is a process that requires a specific reorganization of the cortical actin cytoskeleton to allow the recruitment and subsequent docking of secretory granules to the plasma membrane (Cheek and Burgoyne, 1986; Aunis and Bader, 1988; Lang *et al.*, 2001). Because annexin 2 is an actin-binding protein (Gerke and Moss, 2002) that translocates from the cytosol to the plasma membrane in stimulated cells, it was conceivable that the protein, by interacting with cytoskeletal elements, might clear a path for secretory granules to move to the membrane. However, using rhodamine-conjugated phalloidin to visualize actin filaments, we could not correlate the strong inhibition of secretion induced by the XM fusion mutant to a stabilization of the cortical actin barrier. Thus, annexin 2 seems not to play an obvious role in promoting cortical actin depolymerization, although we cannot exclude other subtle modifications of the actin cytoskeleton that might be required in late stages of the exocytotic machinery.

Another possible function assigned to annexin 2 relates to the late fusion event. Indeed, it has been reported that phosphorylation by PKC triggers the fusion of purified secretory granules preaggregated by unphosphorylated p36 (Regnoui *et al.*, 1995), suggesting that annexin 2 becomes fusogenic when phosphorylated by PKC. Because secretagogue-evoked stimulation activates PKC to phosphorylate endogenous annexin 2 in chromaffin cells (Delouche *et al.*, 1997), annexin 2 has been proposed to mediate membrane fusion once the granule is brought in proximity to the plasma membrane by SNARE proteins (Regnoui *et al.*, 1995). Our amperometric data do not support this hypothesis. We observed that reduction of annexin 2 expression level in chromaffin cells inhibited the number of exocytotic spikes, but the properties of the remaining spikes remained unchanged with respect to charge and kinetics. This suggests that annexin 2 is involved in the recruitment and/or docking of granules to the exocytotic sites. However, its implication in late events such as the formation of the fusion pore remains to be further investigated.

In many cell types, the association of annexin 2 with the plasma membrane seems to occur preferentially at sites of membrane microdomains, the so-called rafts rich in cholesterol, glycosphingolipids, and glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins (Gerke and Moss, 2002). Rafts have been implicated in numerous cellular processes, including signal transduction, molecular sorting, membrane trafficking events, and cell adhesion (Harder *et al.*, 1998; Smart *et al.*, 1999; Dermine *et al.*, 2001). A role for rafts has been recently proposed in regulated exocytosis based on the findings that components of the exocytotic machinery such as syntaxin, SNAP-25, and VAMP2 are associated with rafts (Chamberlain *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2001; Salaun *et al.*, 2004). Lipid rafts are highly dynamic structures that can be very small (a few tens to hundreds of nanometers in diameter) and dispersed but are able to coalesce into large micrometer-sized domains upon cellular stimulation, resulting in the clustering and recruitment of membrane components involved in specific signals or functions (Brown and London, 2000; Abrami *et al.*, 2001; Brown, 2001; Pierini and Maxfield, 2001). Raft dynamics can be influenced by specific proteins, including annexin 2, which has been described as a promoter of lipid microdomain association (Babiychuk and Draeger,

2000). In chromaffin cells, subcellular fractionation experiments have revealed that the translocation of p36 from the cytosol to the cell periphery is accompanied by an increase of the protein in a Triton X-100-insoluble fraction (Chasserot-Golaz *et al.*, 1996; Sagot *et al.*, 1997). Because rafts have been defined by their low density and insolubility in Triton X-100, we examined whether annexin 2 might be involved in the formation of lipid rafts required for exocytosis. We show here that secretagogue-evoked stimulation triggers the Ca<sup>2+</sup>-dependent formation of GM1-containing domains at the plasma membrane in chromaffin cells. These domains are unlikely to reflect the incorporation of the granule membrane into the plasma membrane and as such be a consequence of the exocytotic process because GM1 cannot be detected in the chromaffin granule membrane. The *de novo* synthesis of GM1 seems also unlikely considering the small time window in which the cholera-binding sites occur in stimulated cells and the fact that total GM1 was similar in subcellular fractions prepared from resting and stimulated cells. Thus, it is possible that the increase in cholera toxin labeling observed in stimulated cells resulted from the coalescence of small GM1 microdomains into larger units that bound the pentavalent toxin with an increased affinity due to the multivalent display of the aggregated GM1 molecules (Arosio *et al.*, 2004) or that became simply more easy to detect at the light microscopic level. Alternatively, we cannot exclude that GM1 motives are unmasked during stimulation. Centrifugation on density gradients to separate the low-density rafts and analysis of the cosegregating proteins revealed the specific association of the annexin 2-p11 tetramer to the lipid rafts formed in stimulated cells. Moreover, using chromaffin cells expressing the XM chimera or with reduced endogenous p36, we observed a close correlation between the recruitment of annexin 2 to the cell periphery, the enhancement of cholera toxin binding to the cell surface, and the exocytotic response, suggesting that the annexin 2 tetramer actively participates in the coalescence of GM1-containing microdomains and their stabilization into the larger rafts observed in stimulated cells. Finally, we found that cholesterol sequestration by filipin disrupts the annexin 2-containing rafts and in parallel inhibits catecholamine secretion evoked by various secretagogues, suggesting that the lipid microdomains formed in stimulated cells are required for exocytosis. Together, these results support the idea that lipid microdomains formed/stabilized in the plasma membrane by the annexin 2 tetramer play a key role in the organization of the exocytotic machinery in chromaffin cells.

How might annexin 2 influence the formation of lipid rafts in stimulated cells? Considering the binding domains of the annexin 2-p11 heterotetramer, different scenarios may be evoked. Oligomerization of annexin 2 can occur at the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane. Because one molecule of annexin 2 can bind four molecules of phosphatidylserine (PS), annexin 2 may act directly to trap and cluster PS, thereby creating microdomains in the plasma membrane. As well, annexin 2 has recently been shown to be a phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>)-binding protein (Hayes *et al.*, 2004; Rescher *et al.*, 2004), a major plasma membrane phosphoinositide required in exocytosis for the ATP-dependent priming reactions preceding fusion (Hay *et al.*, 1995; Holz *et al.*, 2000). Thus, another attractive hypothesis is that annexin 2 stabilizes PIP<sub>2</sub> microdomains in the plasma membrane, which in turn recruit specific PIP<sub>2</sub>-binding proteins acting in the subsequent stages of exocytosis (Grishanin *et al.*, 2004). In addition, the cortical actin cytoskeleton may provide constraints for the lateral mobility of rafts and increase their stability. Hence, the annexin 2 tetramer formed

at the plasma membrane may participate in the formation of membrane-cytoskeleton complexes that could control raft assembly. Although additional experimental evidence is now required to explore these possibilities, it is of interest to mention that we found actin in the lipid rafts formed in stimulated cells (our unpublished data), suggesting that the cortical actin cytoskeleton may partner with annexin 2 to stabilize lipid raft domains and organize them into functional exocytotic sites.

The functional characteristics of the sites of exocytosis that ensure tethering of vesicles/granules to the appropriate active zones at the plasma membrane, as well as organization of the exocytotic machinery for rapid and efficient release, remain poorly understood, especially in neuroendocrine cells. Elements with an ability to compartmentalize the plasma membrane and thereby spatially and temporally organize the proteins required for docking and fusion may be crucial for speed and accuracy of the exocytotic process. As such, cholesterol-dependent lipid microdomains are ideally suited to bring together and efficiently assemble components of the exocytotic pathway, and the observations that SNAREs form cholesterol-dependent clusters in the plasma membrane are in line with this idea (Chamberlain *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2001). The present results provide for the first time a molecular support for the *de novo* formation of lipid rafts at the granule docking sites in stimulated neuroendocrine cells. Rise in intracellular calcium triggers the recruitment of cytosolic annexin 2 to the plasma membrane. We propose that p11 is the prime anchor for annexin 2 at plasma membrane. By engaging homophilic lateral interactions and binding to negatively charged phospholipids and phosphoinositides, annexin 2 tetramers could then induce raft clustering. Once formed, raft structures and the associated cholesterol may further stabilize the lipid-annexin 2 interactions, resulting in annexin 2-membrane scaffolds that may be required to assemble components of the exocytotic machinery. It is of interest to note that the calcium-dependent recruitment of annexin 2 to the plasma membrane offers the cell a mechanism to link spatial control of regulated exocytosis to cell surface receptor activation and calcium signaling.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Michael A. Frohman for helpful comments and critically reading the manuscript and S. Grosch and T. Thahouly for technical assistance. We are grateful to F. Gonon (Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte Recherche-5541, Bordeaux, France) for generously providing carbon fiber electrodes. We acknowledge the confocal microscopy facilities of Plateforme Imagerie In Vitro of IFR 37. This work was supported by the Association de la Recherche sur le Cancer (no. 3208).

## REFERENCES

- Abrami, L., Fivaz, M., Kobayashi, T., Kinoshita, T., Parton, R. G., and van der Goot, F. G. (2001). Cross-talk between caveolae and glycosylphosphatidylinositol-rich domains. *J. Biol. Chem.* *276*, 30729–30736.
- Albillos, A., Dernick, G., Horstmann, H., Almers, W., Alvarez de Toledo, G., and Lindau, M. (1997). The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature* *389*, 509–512.
- Ali, S. M., and Burgoyne, R. D. (1990). The stimulatory effect of calpactin (annexin II) on calcium-dependent exocytosis in chromaffin cells: requirement for both the N-terminal and core domains of p36 and ATP. *Cell. Signal.* *2*, 265–276.
- Ali, S. M., Geisow, M. J., and Burgoyne, R. D. (1989). A role for calpactin in calcium-dependent exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Nature* *340*, 313–315.
- Arosio, D., Vrasidas, I., Valentini, P., Liskamp, R.M.J., Pieters, R. J., and Bernardi, A. (2004). Synthesis and cholera toxin binding properties of multivalent GM1 mimics. *Org. Biomol. Chem.* *2*, 2113–2124.
- Aunis, D., and Bader, M. F. (1988). The cytoskeleton as a barrier to exocytosis in secretory cells. *J. Exp. Biol.* *139*, 253–266.
- Ayala-Sanmartin, J., Henry, J. P., and Pradel, L. A. (2001). Cholesterol regulates membrane binding and aggregation by annexin 2 at submicromolar Ca(2+) concentration. *Biochim. Biophys. Acta* *1510*, 18–28.
- Babiyuchuk, E. B., and Draeger, A. (2000). Annexins in cell membrane dynamics. Ca(2+)-regulated association of lipid microdomains. *J. Cell Biol.* *150*, 1113–1124.
- Babiyuchuk, E. B., Monastyrskaya, K., Burkhard, F. C., Wray, S., and Draeger, A. (2002). Modulating signaling events in smooth muscle: cleavage of annexin 2 abolishes its binding to lipid rafts. *FASEB J.* *16*, 1177–1184.
- Bader, M. F., Thierse, D., Aunis, D., Ahnert-Hilger, G., and Gratzl, M. (1986). Characterization of hormone and protein release from alpha-toxin-permeabilized chromaffin cells in primary culture. *J. Biol. Chem.* *261*, 5777–5783.
- Bilderback, T. R., Gazula, V. R., Lisanti, M. P., and Dobrowsky, R. T. (1999). Caveolin interacts with Trk A and p75(NTR) and regulates neurotrophin signaling pathways. *J. Biol. Chem.* *274*, 257–263.
- Brown, D. A. (2001). Seeing is believing: visualization of rafts in model membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *98*, 10517–10518.
- Brown, D. A., and London, E. (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* *275*, 17221–17224.
- Burgoyne, R. D., and Barclay, J. W. (2002). Splitting the quantum: regulation of quantal release during vesicle fusion. *Trends Neurosci.* *25*, 176–178.
- 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. USA* *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.
- Cheek, T. R., and Burgoyne, R. D. (1986). Nicotine-evoked disassembly of cortical actin filaments in adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett.* *207*, 110–114.
- Creutz, C. E. (1992). The annexins and exocytosis. *Science* *258*, 924–931.
- Delouche, B., Pradel, L. A., and Henry, J. P. (1997). Phosphorylation by PKC of annexin 2 in chromaffin cells stimulated by nicotine. *J. Neurochem.* *68*, 1720–1727.
- Dermine, J. F., Duclos, S., Garin, J., St-Louis, F., Rea, S., Parton, R. G., and Desjardins, M. (2001). Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *J. Biol. Chem.* *276*, 18507–18512.
- Ehrhart, M., Grube, D., Bader, M. F., Aunis, D., and Gratzl, M. (1986). Chromogranin A in the pancreatic islet: cellular and subcellular distribution. *J. Histochem. Cytochem.* *34*, 1673–1682.
- Gerke, V., and Moss, S. E. (2002). Annexins: from structure to function. *Physiol. Rev.* *82*, 331–371.
- Graham, M. E., Gerke, V., and Burgoyne, R. D. (1997). Modification of annexin II expression in PC12 cell lines does not affect Ca(2+)-dependent exocytosis. *Mol. Biol. Cell* *8*, 431–442.
- Grishanin, R. N., Kowalchuk, J. A., Klenchin, V. A., Ann, K., Earles, C. A., Chapman, E. R., Gerona, R.R.L., and Martin, T.F.J. (2004). CAPS acts at a prefusion step in dense-core vesicle exocytosis as a PIP2 binding protein. *Neuron* *43*, 551–562.
- Harder, T., and Gerke, V. (1993). The subcellular distribution of early endosomes is affected by the annexin IIp11(2) complex. *J. Cell Biol.* *123*, 1119–1132.
- Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P., and Simons, K. (1998). Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J. Cell Biol.* *141*, 929–942.
- Harder, T., Thiel, C., and Gerke, V. (1993). Formation of the annexin IIp112 complex upon differentiation of F9 teratocarcinoma cells. *J. Cell Sci.* *104*, 1109–1117.
- Hay, J. C., Fiset, P. L., Jenkins, G. H., Fukami, K., Takenawa, T., Anderson, R. A., and Martin, T.F.J. (1995). ATP-dependent inositolide phosphorylation required for calcium-activated secretion. *Nature* *374*, 173–177.
- Hayes, M. J., Merrifield, C. J., Shao, D., Ayala-Sanmartin, J., Schorey, C. D., Levine, T. P., Proust, J., Curran, J., Bailly, M., and Moss, S. E. (2004). Annexin 2 binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on endocytic vesicles is regulated by the stress response pathway. *J. Biol. Chem.* *279*, 14157–14164.
- 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 for exocytosis. *J. Biol. Chem.* 275, 17878–17885.
- Janes, P. W., Ley, S. C., and Magee, A. I. (1999). Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J. Cell Biol.* 147, 447–461.
- Knight, D. E. (1999). Secretion from bovine chromaffin cells acutely expressing exogenous proteins using a recombinant Semliki Forest virus containing an EGFP reporter. *Mol. Cell Neurosci.* 14, 486–505.
- Konig, J., Prenen, J., Nilius, B., and Gerke, V. (1998). The annexin II-p11 complex is involved in regulated exocytosis in bovine pulmonary artery endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 273, 19679–19684.
- Lambert, O., Gerke, V., Bader, M. F., Porte, F., and Brisson, A. (1997). Structural analysis of junctions formed between lipid membranes and several annexins by cryo-electron microscopy. *J. Mol. Biol.* 272, 42–55.
- Lang, T., Bruns, D., Wenzel, D., Riedel, D., Holroyd, P., Thiele, C., and Jahn, R. (2001). SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO J.* 20, 2202–2213.
- Lecat, S., and Lafont, F. (1999). Annexins and their interacting proteins in membrane traffic. *Protoplasma* 207, 133–140.
- Lewit-Bentley, A., Rety, S., Sopkova-de Oliveira Santos, J., and Gerke, V. (2000). S100-annexin complexes: some insights from structural studies. *Cell Biol. Int.* 24, 799–802.
- Liljestrom, P., and Garoff, H. (1991). A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Biotechnology* 9, 1356–1361.
- Mayran, N., Parton, R. G., and Gruenberg, J. (2003). Annexin II regulates multivesicular endosome biogenesis in the degradation pathway of animal cells. *EMBO J.* 22, 3242–3253.
- Nakata, T., Sobue, K., and Hirokawa, N. (1990). Conformational change and localization of calpactin I complex involved in exocytosis as revealed by quick-freeze, deep-etch electron microscopy and immunocytochemistry. *J. Cell Biol.* 110, 13–25.
- Osborn, M., Johnsson, N., Wehland, J., and Weber, K. (1988). The submembranous location of p11 and its interaction with the p36 substrate of pp60 src kinase in situ. *Exp. Cell Res.* 175, 81–96.
- Perrin, D., and Aunis, D. (1985). Reorganization of alpha-fodrin induced by stimulation in secretory cells. *Nature* 315, 589–592.
- Pierini, L. M., and Maxfield, F. R. (2001). Flotillas of lipid rafts fore and aft. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 9471–9473.
- Pollard, H. B., Creutz, C. E., Fowler, V., Scott, J., and Pazoles, C. J. (1982). Calcium-dependent regulation of chromaffin granule movement, membrane contact, and fusion during exocytosis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 46, 2, 819–834.
- Regnoui, F., Sagot, I., Delouche, B., Devilliers, G., Cartaud, J., Henry, J. P., and Pradel, L. A. (1995). "In vitro" phosphorylation of annexin 2 heterotetramer by PKC. Comparative properties of the unphosphorylated and phosphorylated annexin 2 on the aggregation and fusion of chromaffin granule membranes. *J. Biol. Chem.* 270, 27143–27150.
- Rescher, U., Ruhe, D., Ludwig, C., Zobiack, N., and Gerke, V. (2004). Annexin 2 is a phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate binding protein recruited to actin assembly sites at cellular membranes. *J. Cell Sci.* 117, 3473–3480.
- Rety, S., Sopkova, J., Renouard, M., Osterloh, D., Gerke, V., Tabaries, S., Russo-Marie, F., and Lewit-Bentley, A. (1999). The crystal structure of a complex of p11 with the annexin II N-terminal peptide. *Nat. Struct. Biol.* 6, 89–95.
- Sagot, I., Regnoui, F., Henry, J. P., and Pradel, L. A. (1997). Translocation of cytosolic annexin 2 to a Triton-insoluble membrane subdomain upon nicotine stimulation of chromaffin cultured cells. *FEBS Lett.* 410, 229–234.
- Salaun, C., James, D. J., and Chamberlain, L. H. (2004). Lipid rafts and the regulation of exocytosis. *Traffic* 5, 255–264.
- Sarafian, T., Pradel, L. A., Henry, J. P., Aunis, D., and Bader, M. F. (1991). The participation of annexin II (calpactin I) in calcium-evoked exocytosis requires PKC. *J. Cell Biol.* 114, 1135–1147.
- Schafer, B. W., and Heizmann, C. W. (1996). The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem. Sci.* 21, 134–140.
- Senda, T., Okabe, T., Matsuda, M., and Fujita, H. (1994). Quick-freeze, deep-etch visualization of exocytosis in anterior pituitary secretory cells: localization and possible roles of actin and annexin II. *Cell Tissue Res.* 277, 51–60.
- Smart, E. J., Graf, G. A., McNiven, M. A., Sessa, W. C., Engelman, J. A., Scherer, P. E., Okamoto, T., and Lisanti, M. P. (1999). Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol. Cell Biol.* 19, 7289–7304.
- 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.
- Tsui-Pierchala, B. A., Encinas, M., Milbrandt, J., and Johnson, E. M., Jr. (2002). Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends Neurosci.* 25, 412–417.
- 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.
- Voets, T., Moser, T., Lund, P. E., Chow, R. H., Geppert, M., Sudhof, T. C., and Neher, E. (2001). Intracellular calcium dependence of large dense-core vesicle exocytosis in the absence of synaptotagmin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 11680–11685.

### III) Résultats et discussion

Les microdomaines lipidiques sont capables de faciliter la formation de complexes multimoléculaires et pourraient donc participer à l'assemblage de la machinerie d'exocytose (Allen et al., 2007; Pike, 2006; Salaun et al., 2004a). Dans ce contexte, il est intéressant de noter que dans les cellules épithéliales, l'annexine 2 participe à la ségrégation de certains récepteurs dans des microdomaines de la membrane plasmique enrichis en cholestérol (Oliferenko *et al.*, 1999) et que les protéines du complexe SNARE sont présentes dans des radeaux lipidiques (Chamberlain et al., 2001; Lafont et al., 1999; Lang et al., 2001).

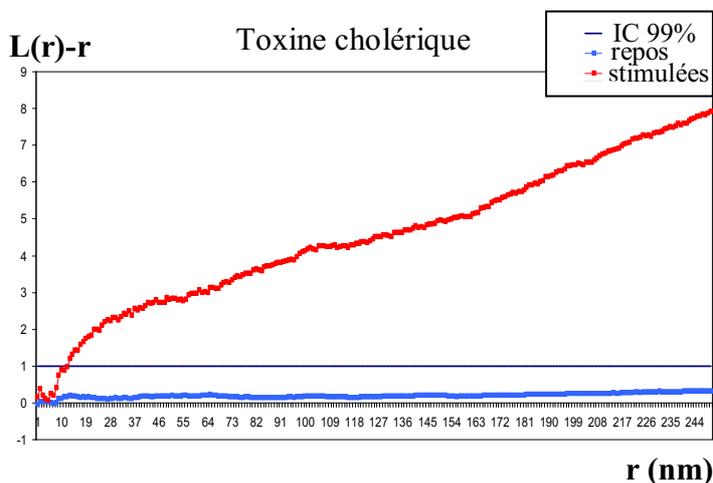
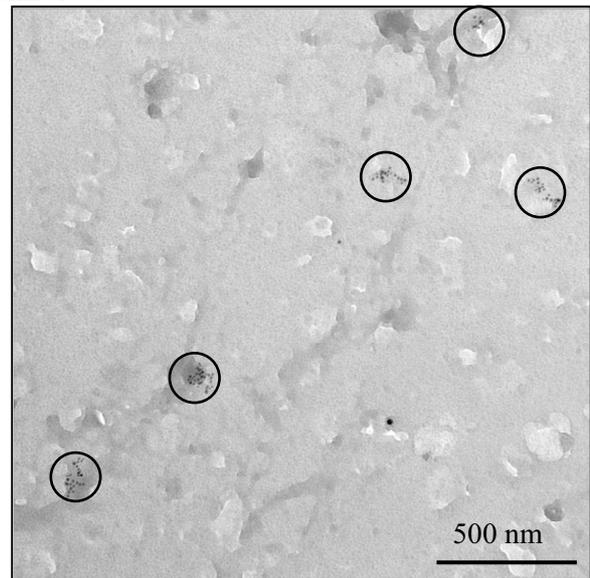
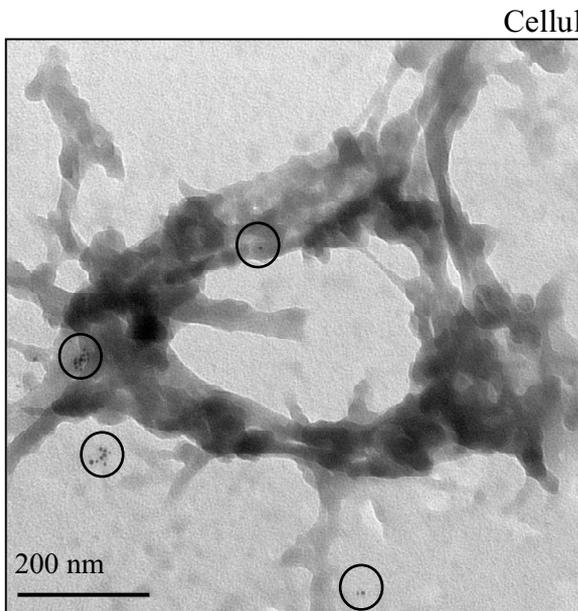
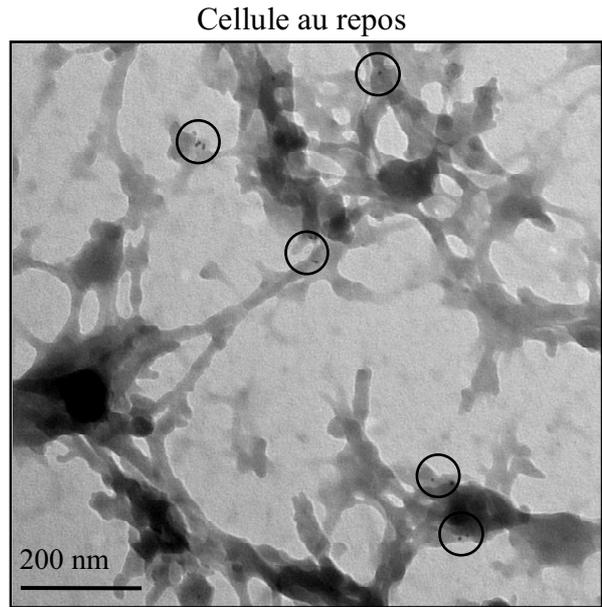
Pour répondre à cette problématique, nous avons tout d'abord recherché la formation de microdomaines lipidiques au cours de la sécrétion. A l'aide de toxine cholérique fluorescente marquant le GM1 des microdomaines, nous avons détecté de faibles marquages dans les cellules au repos, et ces marquages augmentent de manière importante dans les cellules stimulées. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'il y avait une coalescence de nanodomaines non détectables en microscopie optique, en microdomaines détectables. En effet, la toxine cholérique étant pentavalente, son affinité pour le GM1 augmente en fonction du nombre de molécules présentes (Arosio et al., 2004). Elle se lie donc plus fortement aux microdomaines lipidiques, dont la densité de GM1 est plus importante. J'ai ainsi observé qu'après stimulation des cellules par un sécrétagogue, les domaines de la membrane plasmique correspondant aux sites d'exocytose sont fortement marqués par la toxine cholérique. Des expériences de double marquage montrent que l'annexine 2 et la protéine S100A10 colocalisent avec la toxine cholérique fluorescente.

J'ai ensuite étudié par des méthodes biochimiques le contenu protéique des domaines riches en cholestérol de la membrane plasmique de cellules chromaffines au repos et stimulées. L'annexine 2 et la protéine S100A10 ne sont associées aux DRM que dans les cellules stimulées en présence de calcium. En utilisant un agent qui complexe le cholestérol cellulaire, la filipine, j'ai pu établir une corrélation entre la translocation de l'annexine 2, l'apparition de plate-formes lipidiques et la sécrétion induite par différents sécrétagogues, démontrant ainsi l'importance fonctionnelle de ces domaines membranaires dans le processus d'exocytose.

A ce stade, il était tentant d'imaginer la participation de l'annexine A2 dans la formation de microdomaines lipidiques correspondant aux sites d'exocytose dans les cellules stimulées.

**Figure 21 : Mise en évidence de la coalescence des microdomaines lipidiques lors de la stimulation.**

Les cellules sont maintenues au repos ou stimulées avec une solution de nicotine à 20  $\mu$ M pendant 10 min à 37°C en présence de toxine cholérique biotinylée. Après réalisation de feuillettes de membrane plasmique et fixation, le marquage est révélé avec la streptavidine couplée à des billes d'or de 6 nm. Les feuillettes sont ensuite traités pour la visualisation en microscopie électronique à transmission.



**Figure 22 : Analyse statistique de la formation d'agrégats de toxine cholérique dans les cellules au repos ou stimulées.**

Analyse de la distribution spatiale des billes grâce à la fonction K de Ripley. Pour  $-1 < L(r)-r < 1$ , les billes sont considérées comme réparties aléatoirement, pour  $L(r)-r > 1$ , les billes sont considérées comme formant des agrégats. IC 99% correspond à l'intervalle de confiance.

Nous avons donc testé l'effet de l'expression des constructions génétiques dérivées du virus de Semliki et réduisant le taux d'annexine A2 fonctionnelle, sur la coalescence des radeaux. Ces résultats révèlent le rôle actif de l'annexine 2 dans la formation des microdomaines lipidiques au cours du processus d'exocytose. Ainsi l'annexine 2 pourrait participer à la mise en place ou à la stabilisation de plate-formes lipidiques contenant les acteurs moléculaires requis pour l'arrimage des granules.

Pour étudier plus avant la coalescence des microdomaines lipidiques, nous avons réalisé une étude à l'échelle ultrastructurale. La technique de microscopie électronique à transmission sur des feuilletts de membrane plasmique (Hancock, 2006; Hancock and Prior, 2005; Wilson et al., 2004), nous a permis de confirmer notre hypothèse. Le marquage des microdomaines lipidiques a été réalisé à l'aide de toxine cholérique sur des cellules au repos ou stimulées (figure 21). Dans les cellules au repos, des nanodomaines lipidiques de petite taille sont visibles, généralement associés à des structures plus sombres. Dans les cellules stimulées, ces nanodomaines sont regroupés en microdomaines lipidiques plus larges. Pour évaluer de manière quantitative la formation de microdomaines lipidiques dans les cellules stimulées, j'ai utilisé une analyse statistique par la fonction K univariée de Ripley (Figure 22). Cette analyse tient compte de la distance entre les billes d'or colloïdal, et permet de déterminer si les billes sont organisées en agrégats ou réparties aléatoirement (la méthode de calcul est détaillée dans la section matériel et méthodes) par comparaison avec un modèle de distribution aléatoire défini avec un intervalle de confiance de 99% (IC 99%). La fonction  $L(r)-r$  correspondant à la dispersion des particules d'or dans les cellules au repos est comprise entre -1 et 1 quelle que soit la valeur de  $r$ , ce qui traduit une répartition aléatoire des billes. Dans les cellules stimulées,  $L(r)-r$  est supérieure à 1, ce qui correspond à une répartition des particules d'or en agrégats. L'analyse statistique confirme donc la présence de nanodomaines lipidiques dans la membrane des cellules au repos, et leur coalescence en microdomaines lors de l'exocytose.

**Ainsi, l'annexine A2 induit la coalescence de microdomaines lipidiques requis pour l'exocytose des granules à cœur dense.** Récemment, un rôle identique de l'annexine A2 dans l'organisation de microdomaines lipidiques constituant des sites d'exocytose a été décrit lors de la sécrétion de surfactant par les cellules alvéolaires de type II (Chintagari et al., 2006). L'annexine A2 pourrait donc modifier la diffusion latérale des lipides et donc rassembler ou stabiliser des microdomaines qui permettraient l'organisation structurale et spatiale de la machinerie sécrétrice et donneraient une réalité physique à ce que l'on appelle classiquement des sites d'exocytose fonctionnels.



## **B. Comment l'annexine A2 est-elle recrutée près de la machinerie d'exocytose ?**

### **I) Introduction**

A ce stade de nos recherches, nous avons montré que la translocation de l'annexine A2 du cytoplasme vers la membrane plasmique était essentielle à l'exocytose, et que l'annexine A2 formait des microdomaines lipidiques nécessaires à l'activation de la machinerie sécrétrice (publication 1). La question qui s'imposait alors pour continuer cette étude était la suivante : l'annexine A2 est-elle recrutée au niveau de zones précises de la membrane ou sa translocation se fait-elle au hasard ?

Dans un phénomène aussi complexe et finement régulé que l'exocytose, il semble peu probable qu'une place importante soit laissée au hasard. Dans les cellules chromaffines, la libération de catécholamines se produit au niveau de zones restreintes de la membrane plasmique, définies par la présence de agrégats de canaux calciques permettant une entrée localisée de calcium (Robinson et al., 1995). Récemment, l'existence de domaines de protéines SNARE préexistants dans la membrane plasmique de cellules chromaffines isolées a été mise en évidence, et ce serait ces domaines plutôt que les agrégats de canaux calciques qui définiraient les sites d'exocytose (Lopez et al., 2007). Ces domaines de protéines SNARE ont également été observés dans d'autres types cellulaires (Lang et al., 2001; Ohara-Imaizumi et al., 2004; Sieber et al., 2006). Il était alors légitime d'envisager un mécanisme permettant de recruter l'annexine A2 au niveau de ces présites pour compléter et/ou activer la machinerie. Cette idée nous a amenés à considérer l'intervention de S100A10 dans cette étape.

En effet, S100A10 constituait un bon candidat pour recruter spécifiquement l'annexine A2, puisqu'elle est localisée à la membrane plasmique des cellules chromaffines (Chasserot-Golaz et al., 1996; Chasserot-Golaz et al., 2005). La protéine S100A10 est exprimée sélectivement par les cellules adrénergiques et détermine la sensibilité calcique de la translocation de l'annexine A2 et de l'exocytose (Chasserot-Golaz et al., 1996; Evans and Nelsestuen, 1994). S100A10 permet également de modifier la disponibilité de l'annexine A2 comme substrat pour les protéines kinases (Johnsson et al., 1986) et d'accroître certaines des propriétés de l'annexine A2, dont notamment sa capacité à lier plusieurs membranes entre elles (Menke et al., 2004) et à réticuler des filaments d'actine (Filipenko and Waisman, 2001).

On peut également noter que dans d'autres types cellulaires où la forme tétramérique de l'annexine A2 est majoritaire, S100A10 est capable de recruter certaines protéines auprès de l'annexine A2, comme par exemple AHNAK (Benaud et al., 2004). Elle est donc probablement plus une protéine adaptatrice entre l'annexine A2 et d'autres partenaires que simplement une sous-unité du tétramère. S100A10 semblait donc tout indiquée pour permettre un lien fonctionnel entre le recrutement de l'annexine A2 et des complexes moléculaires préexistants dans la membrane plasmique.

S100A10 ne disposant ni d'un domaine transmembranaire, ni d'un site de liaison aux lipides, on peut se demander par quel moyen elle se trouve localisée à la membrane plasmique. Considérant que cette protéine est rapidement dégradée lorsqu'elle n'est pas protégée par son association au sein d'un complexe (Zobiack et al., 2003), il pourrait exister une protéine qui lierait S100A10, permettant ainsi sa localisation à la membrane plasmique et la stabilisant. S100A10 est une protéine ayant de nombreux partenaires protéiques : elle peut interagir avec le récepteur 5HT<sub>1B</sub> de la sérotonine (Svenningsson et al., 2006), certains canaux ioniques comme le canal potassique TASK-1 (Girard et al., 2002), le canal sodique Na<sub>v</sub> 1.8 (Okuse et al., 2002; Poon et al., 2004), ou les canaux calciques TRPV5 et TRPV6 (van de Graaf et al., 2003), et est impliquée dans leur trafic vers la membrane plasmique (Santamaria-Kisiel et al., 2006). Dans le cadre d'un rôle du tétramère d'annexine A2 dans l'exocytose, une interaction de la protéine S100A10 avec une protéine de la machinerie d'exocytose serait fonctionnellement avantageuse. S100A10 appartient à la même superfamille des protéines à domaines « EF-hand » que la calmoduline (Donato, 2001), qui présente la particularité très intéressante de se lier avec l'une des trois protéines SNARE, la VAMP2 (De Haro et al., 2003). Comme les séquences et la structure des protéines de cette superfamille sont très conservées, nous avons donc envisagé que S100A10 puisse interagir également avec VAMP2 et diriger la translocation de l'annexine A2 auprès de présites d'exocytose *via* cette interaction, afin de permettre l'assemblage de la machinerie d'exocytose et/ou l'activation de certains partenaires.

## II) Publication 2

**Umbrecht-Jenck E., Demais V., Calco V., Bailly Y., Bader M.F. and Chasserot-Golaz S..**  
S100A10 recruits Annexin-A2 to SNARE Complexes in Adrenergic Chromaffin Cells during Exocytotic Stimulation. *Soumis au journal Traffic.*

## **S100A10 Recruits Annexin-A2 to SNARE Complexes in Adrenergic Chromaffin Cells during Exocytotic Stimulation**

**Emeline UMBRECHT-JENCK<sup>1</sup>, Valérie DEMAIS<sup>2</sup>, Valérie CALCO<sup>1</sup>,  
Yannick BAILLY<sup>1, 2</sup>, Marie-France BADER<sup>1</sup> and Sylvette CHASSEROT-GOLAZ<sup>1, 2</sup>**

**<sup>1</sup> Département Neurotransmission et Sécrétion Neuroendocrine,  
Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (INCI),**

**UPR 3212 CNRS, Université de Strasbourg,**

**5 rue Blaise Pascal, Strasbourg, F-67084**

**and**

**<sup>2</sup> Plateforme « Imagerie in vitro », IFR37 des Neurosciences,**

**5 rue Blaise Pascal, Strasbourg, F-67084**

### **Proofs and correspondence to:**

Dr. S.CHASSEROT-GOLAZ (address as above)

Tel.: 33-88-45-67-39

Fax: 33-88-60-16-64

Email [chasserot@neurochem.u-strasbg.fr](mailto:chasserot@neurochem.u-strasbg.fr)

**Abbreviations:** DSS, Disuccinimidyl suberate, GST, glutathione S-transferase; PIP<sub>2</sub>, phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate; PM, plasma membrane; SNAP, soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein; SNARE, SNAP receptor; t-SNARE, target SNARE; v-SNARE; vesicle membrane SNARE; VAMP2, vesicle-associated membrane protein 2; TeNT, tetanus toxin.

## SUMMARY

Annexin-A2 has been implicated in neuroendocrine cells as a promoter of GM1-containing lipid microdomains that are required for calcium regulated exocytosis. Since SNAREs (Soluble NSF Attachment Protein Receptors) require a specific lipid environment to mediate granule docking and fusion, we investigated whether annexin-A2-induced lipid microdomains may be linked to the SNAREs present at the plasma membrane. Stimulation of adrenergic chromaffin cells induces the translocation of cytosolic annexin-A2 to the plasma membrane where it co-localizes with SNAP25 and S100A10. Crosslinking experiments performed in stimulated chromaffin cells indicate that annexin-A2 directly interacts with S100A10 to form a tetramer at the plasma membrane. Here, we demonstrate that S100A10 can interact with VAMP2 in vitro and show that VAMP2 is present at the plasma membrane in resting adrenergic chromaffin cells. Tetanus toxin which cleaves VAMP2, releases S100A10 from the plasma membrane, and inhibits the secretagogue-induced translocation of annexin-A2 to the plasma membrane. Immunogold labelling of plasma membrane sheets combined with spatial point pattern analysis confirmed that S100A10 targets annexin-A2 to SNAREs. In addition, these results showed that the formation PIP<sub>2</sub> microdomains colocalized with S100A10 in the vicinity of docked granules, indicating a functional interplay between annexin-A2-mediated lipid microdomains and SNAREs during exocytosis.

## INTRODUCTION

Annexins which are widely expressed in eukaryotic cells, form a family of structurally related calcium- and phospholipid-binding proteins that mediate essential cellular processes, in particular membrane trafficking events, mitotic signalling and cytoskeleton rearrangements [1-5]. Compelling evidence for the involvement of annexin-A2 in calcium-regulated exocytosis has accumulated. Quick-freeze, deep-etch electron microscopic analysis has revealed that annexin-A2 crosslinks secretory granules to the plasma membrane in stimulated neuroendocrine cells [6, 7]. Addition of exogenous annexin-A2 retards the rundown of secretory responsiveness to Ca<sup>2+</sup>-stimulation in permeabilized chromaffin cells [8, 9]. More recently, using a gene knockdown strategy, we obtained direct evidence of a role for annexin-A2 in exocytosis. At the plasma membrane, annexin-A2 was found to promote the formation of GM1/cholesterol-containing lipid microdomains corresponding to active sites of exocytosis [10]. Interestingly, earlier experiments performed on chromaffin cells also indicated that catecholamine release takes place at discrete sites at the plasma membrane [11]. Robinson et al. suggested that clusters of calcium channels which provoked local and restricted rises in cytosolic calcium defined these

exocytotic sites. More recently, however, Lopez et al. proposed that syntaxin1/SNAP25 rather than calcium channel clusters might be responsible for spatial and temporal definition of exocytotic activity [12]. In agreement, morphological studies in various secretory cell types revealed that SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent regions in the plasma membrane [13-15]. Since annexin-A2 mediates cholesterol enriched lipid microdomains that are required for secretion [10], we hypothesized that annexin-A2 may be functionally linked to the SNARE clusters found at the sites of exocytotic fusion.

Annexin-A2 exists either as a monomer, p36 or as part of a heterotetrameric complex p90 with the protein S100A10, an 11 kDa protein also referred to as p11 [16, 17]. S100A10 is the most divergent member of the S100 protein family, as it does not undergo calcium-dependent conformational changes. Even in the absence of calcium, S100A10 is in a permanent "Ca<sup>2+</sup>-on" state and is found as an anti-parallel packed non-covalent homodimer [18]. Several observations suggest that S100A10 plays additional roles than that of a structural scaffold [19, 20]. Depending on the cell type, S100A10 has been described to mediate the translocation of annexin-A2 to the cell surface [21], target annexin-A2 to the cortical cytoskeleton or enhance annexin-A2 dependent bundling of F-actin [22], suggesting that S100A10 is probably actively involved in the mobilization of annexin-A2 for specific functions. Yet, in adrenergic chromaffin cells, the presence of S100A10 at the plasma membrane has been correlated with an increased calcium-sensitivity of the exocytotic machinery [23]. Altogether, these findings led us to propose S100A10 as a candidate to recruit annexin-A2 to the sites of exocytosis, and possibly to the vicinity of the SNAREs mediating granule docking and fusion.

Here, using crosslinking experiments, pull-down assays and tetanus toxin which specifically cleaves the SNARE protein VAMP2, we show that S100A10 is able to physically interact with VAMP2 in vitro and at the plasma membrane in adrenergic chromaffin cells. We demonstrate that upon cell stimulation with a secretagogue, cytosolic annexin-A2 translocates to the plasma membrane-bound S100A10 to form a tetrameric complex. Immunogold electron microscopy of plasma membrane sheets prepared from resting and stimulated cells confirmed that S100A10 and VAMP2 are concentrated in clusters to which annexin-A2 translocates upon stimulation. These findings indicate that S100A10 is able to recruit annexin-A2 to the SNARE complexes present at the plasma membrane, suggesting that annexin-A2 might be a potential functional partner for SNAREs during exocytosis. We propose that the specific lipid environment created by annexin-A2 at the plasma membrane is required for efficient SNARE-mediated membrane fusion.

## RESULTS

### ***S100A10 recruits annexin-A2 to the plasma membrane in stimulated chromaffin cells***

Immunocytochemical experiments performed in resting chromaffin cells indicated that annexin-A2 is distributed throughout the cytoplasm and S100A10 essentially concentrated in the subplasmalemmal region (Fig. 1A). Stimulation with 10  $\mu$ M nicotine triggered the translocation of annexin-A2 to the cell periphery, where it co-localised with S100A10 and a plasma membrane marker SNAP25, as highlighted in the mask images of Fig. 1A. Since annexin-A2 is known to form a tetramer with S100A10 in many cell types, we thought that S100A10 could serve as the docking ligand for annexin-A2 at the plasma membrane in stimulated chromaffin cells.

To probe this idea, we performed crosslinking experiments in permeabilized chromaffin cells maintained in low calcium or stimulated with 20  $\mu$ M free calcium, using the bi-functional crosslinker DSS which reacts with the  $\epsilon$ -amine of lysine. Both resting and stimulated cells were treated with 2 mM DSS and crosslinked products were analysed by Western blot with anti-annexin-A2 and anti-S100A10 antibodies. In calcium-stimulated cells, anti-annexin-A2 antibodies revealed the presence of the 36-kDa annexin-A2 band, as well as two extra bands at 60 kDa and 90 kDa (Fig. 1B). No band was detected in cells maintained in resting cells, in line with the observation that annexin-A2 is mainly soluble at rest (data not shown) and thus probably not associated with a partner. Analysis with anti-S100A10 antibodies revealed, in addition to the 11 kDa band corresponding to S100A10, three bands at 22, 45 and 60 kDa in resting cells, and one additional band at 90 kDa in stimulated cells (Fig. 1B). S100A10 alone is unstable but can be stabilized when bound to certain resident plasma membrane proteins (Santamaria-Kisiel et al., 2006). The presence of several S100A10-containing complexes in both resting and stimulated cells is therefore not surprising. Hence, S100A10 has been most often found as a dimer [24] and the 22 kDa cross-linked product detected here is likely to correspond to the S100A10 dimer. The 45kDa band may correspond to the dimer associated with a protein of about 23kDa. The 60-kDa cross-linked product recognized by both anti-S100A10 and anti-annexin-A2 antibodies increased significantly upon cell stimulation (Fig. 1B). It most likely corresponds to the dimer of S100A10 bound to one molecule of annexin-A2 and may represent an intermediate in the formation of the p90 tetramer. Finally, the occurrence of a  $\sim$  90kDa cross-linked product containing both S100A10 and annexin-A2 indicates the binding of annexin-A2 to S100A10 and the formation of the p90 tetramer in cells stimulated with a secretagogue (Fig. 1B). Furthermore, when the p90 tetramer forms annexin-A2 interacts with S100A10 and this may

contribute to the stabilization of annexin-A2 at the plasma membrane.

### ***S100A10 interacts with VAMP2 in vitro***

At the plasma membrane, annexin-A2 promotes lipid microdomains required for exocytosis (Chasserot et al., 2005). To probe the idea that the annexin-A2-mediated lipid microdomains may be formed in the vicinity of the SNARE clusters, interactions between S100A10 and the SNARE proteins were examined. We focused our attention on VAMP2 as a potential candidate because S100A10 shares sequence homology with calmodulin [25] and VAMP2 has been described as a  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin binding-protein [26]. Using a GST-fusion protein pull down assay, interactions between S100A10 and VAMP2 were first studied in vitro. As illustrated in Fig. 2, purified S100A10 was found to bind to GST-VAMP2<sub>1-96</sub> fusion protein in a dose-dependent manner. Maximal binding was achieved in the presence of 3  $\mu$ g of purified S100A10 (Fig. 2A). Thus, S100A10 can directly interact with VAMP2 in absence of calcium. In this respect, it is interesting to note that the molecular weight of VAMP2 corresponds to that of one of the products crosslinked with S100A10 in resting condition (45kDa band).

To further characterize the binding site on VAMP2, we performed competition experiments between S100A10 and calmodulin in the absence or presence of calcium (Fig. 2B), as VAMP2 binds to calmodulin in a calcium-dependent manner [26]. We found that calmodulin decreased the binding of S100A10 to GST-VAMP2 in a dose-dependent manner, but only in the presence of calcium (Fig. 2B). In other words, S100A10 and calmodulin interact with VAMP2 in a competitive manner, suggesting that the binding site for S100A10 may be close to or overlap the calmodulin-binding site, which corresponds to residues 77–94 of VAMP2, nearby the tetanus toxin cleavage site (Q76–F77) [26].

### ***VAMP2 co-localizes with S100A10 at the plasma membrane in adrenergic chromaffin cells***

Next, the intracellular distribution of VAMP2 in chromaffin cells was examined. Subcellular fractionation experiments and Western blotting indicated that VAMP2 was mainly found in fractions containing secretory granules as revealed by the presence of the granular protein chromogranin A (CGA) (Fig. 3A). However, VAMP2 was also detected in the upper layers of the gradient corresponding to the plasma membrane-enriched fractions as indicated by the presence of SNAP25 (Fig. 3A).

VAMP2 was also localized in chromaffin cells by immunocytochemistry and confocal microscopy. Fig. 3B shows that VAMP2 is present throughout the cytoplasm of chromaffin cells, partially associated with CGA-positive organelles as highlighted in the mask image, and to smaller vesicular-like structures. This punctuate labelling is

likely to reflect VAMP2 on chromaffin granules and probably synaptic-like vesicles, in line with the distribution of VAMP2 previously reported in PC12 cells [27]. Moreover, we found that ~ 60 % of the cell population displayed an accumulation of VAMP2 in the subplasmalemmal region (Fig. 3B), suggesting that VAMP2 may also be associated with the plasma membrane in a subpopulation of chromaffin cells. Indeed, double labelling experiments performed with VAMP2 and phenylethanolamine N-methyl transferase (PNMT) antibodies to identify adrenergic chromaffin cells [28], showed that subplasmalemmal localization of VAMP2 occurred only in the PNMT-positive adrenergic cells and not in noradrenergic cells (Fig. 3B). Moreover, triple-labelling experiments performed with S100A10, PNMT and CGA antibodies also indicated that S100A10 was selectively expressed in adrenergic cells (Fig. 3C). Thus, in addition to its classical association with secretory organelles, VAMP2 seems to be present at the plasma membrane, but only in cells expressing S100A10 and corresponding to the adrenergic chromaffin cell phenotype.

***Cleavage of VAMP2 by tetanus toxin releases S100A10 from the plasma membrane and inhibits translocation of annexin-A2 in cells stimulated for exocytosis***

To confirm a S100A10-VAMP2 interaction at the plasma membrane in adrenergic chromaffin cells, the distribution of S100A10 was examined after selectively cleaving VAMP2 with tetanus toxin [29]. Initially, crude chromaffin cell membranes were treated with tetanus toxin light chain, and the amounts of S100A10 and VAMP2 detected in the pellet or released into the supernatant were analyzed by Western blot. As illustrated in Figure 4A, tetanus toxin cleaved VAMP2 and partially solubilised S100A10, indicating that VAMP2 is required to maintain S100A10 in the membrane fraction. Secondly, the effect of tetanus toxin on the distribution of S100A10 in chromaffin cells is shown in Fig. 4B. In permeabilized cells treated with tetanus toxin the amount of S100A10 detected in the cytoplasm clearly increased, in agreement with the idea that VAMP2 is required to maintain and stabilize S100A10 at the plasma membrane in adrenergic cells.

Next, we studied the effect of tetanus toxin on secretagogue-evoked translocation of annexin-A2 to the plasma membrane. In stimulated chromaffin cells, granule fusion with the plasma membrane triggers transient accessibility of intra-luminal membrane-associated granule proteins, like dopamine- $\beta$ -hydroxylase (DBH), to the extracellular space. Using this principle, exocytotic activity on the chromaffin cell surface can be visualized by incubating living cells with anti-DBH antibodies [23]. In agreement with previous studies [30], tetanus toxin inhibited exocytotic activity in chromaffin cells as seen by the lack of cell surface DBH labelling in calcium-stimulated cells (Fig. 4C). Tetanus toxin also inhibited the  $Ca^{2+}$ -induced translocation of annexin-A2 to the plasma

membrane (Fig. 4C). An analysis of cells displaying a peripheral annexin-A2 labelling revealed that tetanus toxin at 160 nM totally inhibited the translocation of annexin-A2 to the plasma membrane in approximately 60% of the  $Ca^{2+}$ -stimulated chromaffin cell population (Fig. 4D).

Taken together, these results indicate that the interaction between VAMP2 and S100A10 is sensitive to tetanus toxin-induced cleavage of VAMP2. Moreover, VAMP2 seems to be required for the stabilization of S100A10 at the plasma membrane and, consequently, for the translocation of annexin-A2 to the plasma membrane in response to secretagogue-evoked stimulation.

***S100A10 VAMP2 and syntaxin co-localize in clusters on plasma membrane sheets from resting chromaffin cells***

To further explore the spatial relationship between S100A10 and VAMP2, experiments were designed to analyze the inner face of the plasma membrane. Using an immunogold electron microscopy approach, the distribution of the two proteins was examined on native cytosolic plasma membrane sheets. This technique has been previously used to analyse Ras [31] and Fc receptor I [32] signalling pathways. Hence, large pieces of the plasma membrane with their embedded protein complexes are preserved on the membrane sheets, including membrane receptors together with their cytoplasmic domains and associated signalling and adaptor molecules. These scaffolds can be visualized by immunogold staining using gold particles of different sizes. We performed double labelling experiments for S100A10/VAMP2 and S100A10/syntaxin using a combination of 6- and 10-nm gold particles (Fig. 5). In membranes prepared from resting chromaffin cells, a patchwork of dark and light stained regions could be distinguished (Fig. 5A and D). This pattern was very similar to that previously reported for membrane sheets prepared from mast cells [33], T cells [34] and fibroblasts [35]. The dark osmophilic regions may correspond to the protein islands previously described by Lillemeier and co-workers [34] to contain cholesterol, membrane-associated proteins and actin. Gold particles in double labelling experiments tended to accumulate predominantly in the dark areas of the membrane sheets (Fig. 5A and D). At higher magnifications, S100A10 and VAMP2 or S100A10 and syntaxin were found to form mixed clusters (Fig. 5B and E). The extent of clustering and/or co-localization of the two labelling was determined using Ripley's K-function statistical analysis [35, 36]. Ripley's K-function establishes an exhaustive map of the inter-particle distances over the entire studied surface. To interpret the statistical significance of positive or negative deviations from 0, indicating clustering or dispersal of the pattern respectively, the coincidence interval (C.I.) was generated and the observed distribution was compared with that expected from a random distribution [31, 37]. Bivariate K-function analysis of double-labelled samples revealed that S100A10 and VAMP2 co-

localized in resting cells within clusters displaying a 20-40 nm radius (Fig. 5C). This close association between S100A10 and VAMP2 correlated well with our biochemical data indicating a possible interaction between these two proteins. Similarly, S100A10 and syntaxin co-distributed within clusters of 20-40 nm (Fig. 5E). However, in some membrane sheets, this was not observed. No S100A10 and VAMP2 labelling was observed but syntaxin labeling was found (Data not shown). This is likely to correspond to membrane sheets of noradrenergic cells where S100A10 and VAMP2 are absent as shown in Fig.3. In other words, S100A10 is associated with VAMP2 and syntaxin within clusters present at the plasma membrane of resting adrenergic chromaffin cells.

### ***S100A10 recruits annexin-A2 near SNARE complexes***

The association between S100A10 and SNARE in resting cells fits well with the idea that S100A10 allows the recruitment and targeting of cytosolic annexin-A2 to the plasma membrane in the vicinity of the SNARE complexes following stimulation with a secretagogue. To assess this hypothesis, double immuno-labelling experiments were performed on membrane sheets prepared from nicotine-stimulated chromaffin cells using a combination of 10- and 15-nm gold particles to detect respectively S100A10 and annexin-A2. As illustrated in Fig. 6A, dense core granules docked at the plasma membrane could be observed under these conditions. Most interestingly, 10 and 15 nm gold particles were concentrated at the anchoring points of the granules (Fig. 6A). The close proximity (less than 50 nm) of the two types of gold particle is consistent with the formation of the p90 annexin-A2 tetramer near the chromaffin granule docking sites.

To determine whether the p90 tetramer is formed near the SNARE complexes due to the S100A10-VAMP2 interaction, double labelling experiments were performed to detect annexin-A2 and syntaxin on membrane sheets prepared from stimulated cells. As illustrated in Figure 6B, the distribution of the 6- and 10-nm gold particles was consistent with a co-localization of annexin-A2 and syntaxin. Both proteins were found at the base of docked granules, in line with the assumption that annexin-A2 is specifically recruited to pre-existing SNARE clusters present at the plasma membrane.

### ***Cell stimulation triggers the formation of PIP<sub>2</sub> microdomains colocalized with S100A10 at granule docking sites***

PIP<sub>2</sub> is generally enriched in lipid rafts containing GM1 [38] and the formation of PIP<sub>2</sub> domains at syntaxin clusters is essential for regulated exocytosis [39] and efficient SNARE-mediated membrane fusion [40, 41]. Since annexin-A2 is a well-known phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate (PIP<sub>2</sub>)-binding protein [42] and our earlier data indicated that annexin-A2 acts as a calcium-dependent promoter of GM1-enriched microdomains in stimulated chromaffin cells [10],

we next compared the distribution of PIP<sub>2</sub> and S100A10 on membrane sheets prepared from resting and secretagogue-stimulated cells. In resting chromaffin cells (Fig. 7A, C), PIP<sub>2</sub> was distributed over the whole membrane as singlet and small-dispersed clusters of 2-3 gold particles (arrow in Fig. A) and S100A10 formed clusters (stars in Fig. A, C). In contrast, stimulation of the cells induced a redistribution of PIP<sub>2</sub> in larger clusters containing both S100A10- and PIP<sub>2</sub>-bound particles (Fig. 7B,D). Analysis of the spatial distribution of PIP<sub>2</sub> labelling by pooled K-function (Fig. 7E) confirmed that PIP<sub>2</sub> was randomly distributed in resting cells, but was significantly clustered in stimulated conditions. The bivariate K-function analysis of the dual labelling S100A10-PIP<sub>2</sub> (Fig. 7F) showed that S100A10 and PIP<sub>2</sub> form clusters displaying a 20-40 nm radius in resting conditions and a 125-150 nm radius in stimulated cells. These clusters were mainly concentrated at the border of docked granules. Indeed 56% of these clusters were located within 50 nm of the granule border (Fig. 7G). The analysis of the relative distribution of the PIP<sub>2</sub>-bound particles in function of their distance from the border of the granules revealed that the most of these particles were present at the border of the secretory granules in stimulated cells (Fig. 7H). In this case, the accumulation of PIP<sub>2</sub>-bound particles seems to be specific and not due a detection limitation. Indeed, very few particles were found within the first 50 nm under the granules.

Taken together these results suggest that PIP<sub>2</sub> domains are concentrated at the anchoring points of the granules where annexin-A2 and syntaxin were also detected (Fig 6B). This provides evidence that the S100A10 recruitment of annexin-A2 leads to the formation of PIP<sub>2</sub> microdomains close of SNARE complexes, thereby creating functional exocytotic sites where secretory granules dock and undergo fusion [12].

## **DISCUSSION**

Annexin-A2 has been implicated in regulated secretion in many cell types including neuroendocrine cells, but its precise function in the molecular machinery underlying exocytosis remains elusive [5]. In chromaffin cells, we have previously shown that annexin-A2 translocates from the cytosol to the plasma membrane upon cell stimulation promoting the formation of GM1/cholesterol-containing lipid microdomains at the plasma membrane that seem to be essential for calcium regulated exocytosis [10]. The relationship demonstrated here between annexin-A2 translocation and plasma membrane-associated SNAREs is particularly relevant considering that syntaxin, SNAP-25 and VAMP2 must be associated with cholesterol and PIP<sub>2</sub>-enriched lipid domains to efficiently dock and fuse chromaffin granules with the plasma membrane [13, 39, 40, 43]. Annexin-A2 formed a tetrameric complex with S100A10 at the plasma membrane in stimulated chromaffin cells and S100A10 was found to interact with VAMP2 using crosslinking and GST pull-down

assays. A S100A10-VAMP2 interaction seems to be required to retain annexin-A2 at the plasma membrane as the cleavage of VAMP2 by tetanus toxin, also inhibited annexin-A2 translocation in stimulated cells. In addition, S100A10 was identified in SNARE-containing microdomains at the inner surface of the plasma membrane. Spatial point pattern analysis of dual S100A10-VAMP2 or S100A10-syntaxin labelling suggests the association of S100A10 with 50 nm SNARE clusters within the plasma membrane. The size of these SNARE domains is in agreement with the value obtained from STED-microscopic studies (Sieber et al., 2006). Moreover, these domains have been suggested to define the sites where secretory granules fuse with the plasma membrane [12, 15]. Finally, S100A10 was observed to recruit annexin-A2 to these SNARE clusters upon cell stimulation and at the same time PIP<sub>2</sub> and docked secretory granules appeared in these S100A10/SNARE-containing microdomains. Since annexin-A2 is a well-known PIP<sub>2</sub>-binding protein, annexin-A2 may serve as a calcium-dependent promoter of GM1/PIP<sub>2</sub> enriched microdomains, providing the appropriate lipid environment for SNARE complexes to mediate efficient tethering, docking and fusion. Additionally, our data reveal a new role for S100A10 in vesicular trafficking, as an anchor capable of recruiting annexin-A2 to SNARE proteins.

#### ***S100A10: a multi-functional protein at the plasma membrane in adrenergic cells***

Recent observations have changed the view of S100A10, as a mere structural scaffold in the annexin-A2-S100A10 complex to a direct and active regulator for a number of cellular proteins [20]. In most cell types, S100A10 resides in a tight hetero-tetrameric complex with annexin-A2. However, additional interactions between S100A10 and other plasma membrane-resident proteins have been described and in most cases, S100A10 appears to regulate the intracellular trafficking of these proteins towards the plasma membrane [44]. For example, S100A10 has been identified as an binding partner for the sodium channel Nav 1.8 [45] and the potassium channel TWIK-related acid sensitive K (TASK) 1 [46], and it has been suggested that the interaction with S100A10 is important for TASK to attain the plasma membrane [46]. S100A10 also binds to and regulates the activity of the plasma membrane-resident serotonin 5-HT<sub>1B</sub> receptor [47]. Thus, S100A10 plays a role in the trafficking of plasma membrane proteins. By binding to the cytosolic domain of VAMP2, S100A10 may well serve to maintain VAMP2 at the plasma membrane and prevent its endocytosis [48]. Since, S100A10 also stabilizes annexin-A2 at the plasma membrane [49], the interaction of S100A10 with VAMP2 implies de facto that annexin-A2 is directed and maintained near SNARE complexes following its translocation to the plasma membrane. Finally, a direct regulatory role of S100A10 in the formation of the SNARE complexes needs to be considered. The interaction of S100A10 with VAMP2 may prevent the

formation of tight SNARE cis complexes in the plasma membrane and thereby facilitate the formation of trans complexes between plasma and granule membranes during exocytosis. Along this same line, S100A10 is a known inhibitor of phospholipase A<sub>2</sub> [50, 51]. By reducing the production of arachidonic acid nearby the SNAREs, S100A10 may facilitate the structural changes required for the binding of syntaxin to SNAP25 [52]. Altogether, S100A10 appears particularly well suited as a functional partner for SNAREs in the molecular machinery underlying exocytosis.

#### ***Annexin-A2 is recruited near the SNARE complexes***

We show here that stimulation with a secretagogue triggers the recruitment of annexin-A2 to SNARE clusters and concomitantly the formation of PIP<sub>2</sub> microdomains at the plasma membrane granule docking sites. Along the same line, we previously described that annexin-A2 triggers the formation of cholesterol/GM1-enriched microdomains at the granule fusion sites in stimulated chromaffin cells [10]. Since annexin-A2 is a PIP<sub>2</sub>-binding protein, it is tempting to speculate that annexin-A2 is responsible for the formation of the PIP<sub>2</sub>-enriched lipid domains that appear in the vicinity of the SNARE complexes and granules docked at the plasma membrane. PIP<sub>2</sub> is a minor component of the lipid bilayer, but plays an essential role in various cellular functions, including exocytosis and endocytosis [53]. Most importantly, PIP<sub>2</sub> has been described to form microdomains in the plasma membrane [39, 54, 55] which seem to be required for efficient SNARE-mediated docking and fusion of granules with the plasma membrane [13, 39, 43]. Yet, the rate of lateral diffusion of PIP<sub>2</sub> within the lipid bilayer is most likely much faster than its rate of local biosynthesis, and PIP<sub>2</sub> clustering probably requires diffusion barriers that can be provided by proteins that are capable of binding to PIP<sub>2</sub> and/or cytoskeletal proteins. Among the large number of PIP<sub>2</sub>-binding proteins, annexin-A2 tetramer is particularly attractive for this putative role since it binds the membrane both in a Ca<sup>2+</sup>- and PIP<sub>2</sub>-dependent manner [56, 57], laterally aggregates on the membrane surfaces [58] and interacts with F-actin [59]. In other words, annexin-A2 possesses the biophysical properties necessary for organizing PIP<sub>2</sub> clusters in the plasma membrane. In line with this idea, the annexin-A2 tetramer has been described to induce the formation of stable PIP<sub>2</sub> patches in the presence of cholesterol that remain accessible to other PIP<sub>2</sub>-binding proteins, as evidenced by undeterred binding of the PLC $\beta$ 1-PH domain (Gokhale et al. 2005). Thus, within cells, annexin-A2 is expected to bind the plasma membrane containing PIP<sub>2</sub> and cause PIP<sub>2</sub> clustering. Additionally, the dual interactions of annexin-A2 with both the membrane and the actin cytoskeleton may severely limit the mobility of these PIP<sub>2</sub> clusters. Finally, the fact that annexin-A2 is a Ca<sup>2+</sup>-dependent protein that is recruited to the plasma membrane upon a rise in cytosolic calcium is a particularly attractive feature in the context of calcium-regulated secretion which could

account for a expected calcium sensitivity of the PIP<sub>2</sub> - SNARE clusters.

### ***What happens in noradrenergic cells?***

The presence of S100A10 and VAMP2 at the plasma membrane solely in adrenergic chromaffin cells raises the question of how annexin-A2 is recruited to the plasma membrane of noradrenergic cells upon stimulation. Since annexin-A2 is a calcium-dependent phospholipid-binding protein, it may well associate directly with the plasma membrane lipid bilayer in stimulated noradrenergic cells. Alternatively, other S100-related proteins which interact with annexin-A2 in the presence of calcium could account for the annexin-A2 recruitment in noradrenergic cells. Indeed, the binding of S100A11 to annexin-A2 occurs at a rate comparable to that observed for certain membrane fusion processes [60], S100A6 has been involved in the calcium signalling pathway underlying exocytosis in various secretory cell types [61] and S100A4 is apparently expressed in a subpopulation of chromaffin cells [62]. Thus, the presence of these S100-related proteins in noradrenergic chromaffin cells needs to be investigated.

Some differences in catecholamine secretion observed between adrenergic and noradrenergic cell types may be partially explained by differences in the exocytotic machinery [63] in particular the absence of S100A10 in noradrenergic chromaffin cells [23]. It might also imply that VAMP2 is not retained at the plasma membrane in noradrenergic cells but is endocytosed as has been previously described at the dendritic surface of neurons [48]. Along this line, in the noradrenergic PC12 cell line that does not express S100A10 [64], VAMP2 is not detected at the plasma membrane [27]. The absence of S100A10 might also imply that the delivery of annexin-A2 to the SNARE-containing exocytotic sites occurs through a distinct mechanism in noradrenergic cells. In this context, it is interesting to recall that adrenergic and noradrenergic cells display distinct calcium affinities to trigger exocytosis. Indeed more calcium is required to stimulate the translocation of annexin-A2 and trigger exocytosis in noradrenergic chromaffin cells supporting the idea that the absence of S100A10 in these cells confers a lower calcium affinity to the exocytotic pathway [23]. The absence of S100A10 in noradrenergic cells also suggests that the annexin-A2 tetramer is not formed in these cells. Considering that the annexin-A2 tetramer has at least a 10 times higher affinity for PIP<sub>2</sub>-containing vesicles than the annexin-A2 monomer [65], the lipid composition required to built a site for exocytosis may be specific for each catecholaminergic phenotype.

In conclusion, these data provide evidence for a tight coupling between S100A10/annexin-A2 and VAMP2 in adrenergic cells. The targeting of annexin-A2 to SNARE clusters is likely to be crucial in the control of the speed and accuracy of the exocytotic process because annexin-A2 can compartmentalize the plasma membrane by

spatially organizing lipids like PIP<sub>2</sub> and proteins involved in granule docking and fusion. Moreover, it is of interest to note that the calcium-dependent interaction of annexin-A2 with the plasma membrane may provide the cell with a mechanism linking the spatial control of regulated exocytosis to cell surface receptor activation and calcium signalling.

## **MATERIALS AND METHODES**

### ***Antibodies, reagents, and plasmids***

Rabbit polyclonal antibodies against Annexin-A2 (p36) purified from bovine aorta were used at 1:200 dilution (generous gift of J.C. Cavadore, Inserm U-249). Mouse monoclonal (Transduction Laboratories Lexington, KY, USA) and goat polyclonal antibodies (Santa-Cruz Biotechnology, Inc., Santa-Cruz, California, USA) against S100A10 were diluted at 1:50 for immunochemistry. Rabbit polyclonal antibodies against dopamine β-hydroxylase (EC.1.14.17.1: DBH) were used at a 1:50 dilution to specifically label secretory granules in chromaffin cells [66, 67]. Mouse monoclonal antibody against VAMP2 (Synaptic System, Goettingen, Germany) was used at 1:50 for immunochemistry and at 1:10000 for Western blots. Rabbit polyclonal antibody against GST (Molecular probes - Invitrogen, Cergy Pontoise, FR) was used at 1:2500. Mouse monoclonal antibody against PIP<sub>2</sub> (Assay Designs Inc., Ann Arbor, Michigan, USA) was used 1:50 for immunochemistry. Rabbit polyclonal antibodies against chromogranin A from bovine chromaffin granules (Bader et al., 1981) were diluted at 1:2000 for Western blot and at 1:200 for immunochemistry. Sheep polyclonal antibodies against bovine phenyl ethanolamine N-transferase (PNMT, Chemicon International Inc., Temecula, California, USA) were used at 1:200 dilution. Monoclonal antibodies against syntaxin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) and against SNAP25 (Sternberger Monoclonals Inc, Lutherville, Maryland, USA) were used at 1:50. Secondary antibodies coupled to Alexa conjugates (488, 555 or 647) or gold particles were from Molecular Probes (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and Aurion (Wageningen, NL) respectively. Purified calmodulin from human brain was purchased from Merck Chemicals Ltd. (Nottingham, UK). Disuccinimidyl suberate (DSS) was purchased from PIERCE, Rockford, IL. The S100A10 expression vector derived from pET-23a, GST-VAMP2<sub>1-96</sub> fusion protein and Tetanus toxin were kindly provided respectively by Dr. J. Ayala-Sanmartin, Dr. M. Seagar and Dr. P. Bocquet.

### ***Culture and permeabilization of chromaffin cells***

Chromaffin cells were isolated and maintained in culture as previously described (Bader et al., 1986). To trigger exocytosis, chromaffin cells were washed twice with Locke solution (140 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 11 mM glucose, 0.56 mM ascorbic acid and 15 mM Hepes, pH 7.2) and stimulated 10 min

with Locke's solution containing 20  $\mu$ M nicotine. Permeabilization of chromaffin cells with streptolysin-O (SLO; Institut Pasteur, Paris, France) was performed as previously described (Sarafian et al., 1991). Briefly, cells were washed with calcium-free Locke's solution (containing 1mM EGTA) and then permeabilized for 2 min at 37°C with SLO (18U/ml) in 200 $\mu$ l calcium-free permeabilizing medium KGATP (150 mM glutamate, potassium salt, 10 mM Pipes, 5 mM NTA, 0.5 mM EGTA, 5 mM Mg-ATP, 4.5 mM magnesium). Then cells were treated with Tetanus toxin (150nM) for 10 min in KGATP with DTT (1mM). Secretion was induced in permeabilizing medium containing 20  $\mu$ M of calcium free for 10 min and then cells were fixed.

### **Immunoblotting, immunofluorescence and confocal microscopy**

One dimensional SDS gel electrophoresis was performed on 10 % polyacrylamide gels or on 4 to 20% polyacrylamide concentration gradient gels (Invitrogen), in Tris-Glycine-SDS buffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 0.5% SDS). After transferring proteins to nitrocellulose membranes, and immunoblotting, detection was performed by chemiluminescence using the Super Signal West Dura Extended Duration Substrate kit (Pierce). For immunocytochemistry, chromaffin cells, grown on fibronectin-coated glass coverslips, were fixed and labelled as described previously [23]. The transient accessibility of DBH on the plasma membrane of SLO-permeabilized chromaffin cells was tested by incubating cells, for 10 min, in KGATP containing 20  $\mu$ M calcium free and anti-DBH antibodies diluted to 1:50. Labelled cells were visualized using a Zeiss confocal microscope LSM 510.

### **Crosslinking in permeabilized cells**

Chromaffin cells were seeded on 24-multiwell plates. After washing with calcium-free Locke solution, cells were permeabilized with SLO 2 min and stimulated 5 min in KGATP buffer with or without calcium. Then cells were incubated 30 min at room temperature under gentle agitation in CL buffer (40 mM Hepes, pH 7.4; 150 mM KCl, 2% DMSO) with (stimulated cells) or without (resting cells) 20  $\mu$ M  $\text{CaCl}_2$ . To achieve cross linking 2 mM DSS was added. The reaction was stopped by addition of 100 mM Tris-HCl pH 7.4. After a gentle 15 min-agitation at room temperature, the medium was discarded and the cells from 4 wells were pooled in 1ml PBS, centrifuged (10 min, 10000 g) and the pellet was analyzed by Western blot.

### **Purification of S100A10**

The purification of S100A10 was performed as described previously [68] with the following modifications. BL21 *Escherichia coli* cells were treated with 1 mM IPTG for 3 h to induce expression of S100A10. Cells were centrifuged 25 min at 3800 g, resuspended and sonicated in lysis buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM DTT) with a protease inhibitor cocktail (Sigma). After centrifugation (10 min at

15000 g), proteins were precipitated from the supernatant with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  at 50% saturation at 4°C for 15 min, and cleared by centrifugation (15 min at 30000 g). The supernatant was then submitted to a butyl-Sepharose batch purification by successively washing with a lysis buffer saturated with decreasing concentrations of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (50% to 0%). The last fraction containing S100A10 was dialysed against DE52 buffer (10 mM imidazole, pH 7.4, 1 mM EGTA, 0.1 mM EDTA, 30 mM NaCl, 0.5 mM DTT), and passed through a DEAE-cellulose column. The flow-through fractions containing S100A10 were dialysed against PBS, concentrated with 1kD Macrosep centrifugal device (Pall Life Science), and then stored at -20°C.

### **GST pull-down**

GST-VAMP2<sub>1-96</sub> fusion protein [69] and GST were produced in BL21 *Escherichia coli* strain, and bound to glutathione-sepharose beads following the binding instructions of the manufacturer (Amersham, Les Ulis, France). Production and purification were checked by SDS-PAGE. GST and GST-VAMP2<sub>1-96</sub> beads were washed 3 times with pull-down buffer (40 mM Hepes, pH 7.4, 100 mM KCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1% NP40) and subsequently saturated with pull-down buffer containing 0.5% BSA, overnight at 4°C. Increasing concentrations of purified S100A10 were incubated for 3 h at 4°C with 15  $\mu$ g GST or GST-VAMP2<sub>1-96</sub> beads. The beads were extensively washed with pull-down buffer and analysed by Western blot.

### **Subcellular fractionation**

For subcellular fractionation, cultured chromaffin cells were collected and homogenized in 0.32 M sucrose, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, and then centrifuged at 800 g for 15 min. The supernatant (cell lysate) was further centrifuged at 20 000 g for 20 min. The 20,000 g pellet containing the crude membrane fraction was resuspended in 0.32 M sucrose (10 mM Tris-HCl, pH 7.4), layered on a continuous sucrose density gradient (1–2.2 M sucrose, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4), and centrifuged for 90 min at 100,000 g. Twelve fractions were collected from the top to the bottom and analyzed for protein content with the Bradford reagent. The distribution of SNAP-25 (plasma membrane marker) and chromogranin A (chromaffin granule marker) was analysed in fractions 2–12 (40  $\mu$ g of protein per fraction) by Western blot.

In some experiments, chromaffin cells were scraped in KGATP buffer and centrifuged for 15 min at 100,000 g. The pellet containing the crude membranes was homogenized in 500  $\mu$ l of the KGATP with or without Tetanus toxin light chain (150 nM), incubated for 30 min at room temperature, and then centrifuged for 15 min at 100,000 g. Pellets and supernatants were solubilised, and the presence of annexin-A2, S100A10 and VAMP2 proteins was analyzed by electrophoresis and immunoblotting.

### **Preparation and scanning EM of plasma membrane sheets**

Cytoplasmic face-up membrane sheet were prepared and processed as described by [70] with some modifications. Briefly, carbon-coated Formvar films on nickel electron microscopy grids were inverted onto chromaffin cells grown on fibronectin-coated coverslips. Pressure was applied to the grids for 20 s by bearing down with a cork. The grids were lifted, leaving fragments of the upper cell surface adherent to the grid. These membranes portions were fixed in 2% paraformaldehyde for 10 min at 4°C immediately after cell stimulation and sheet preparation, which required less than 30 s. After blocking in 1% BSA, the two immunolabellings were performed simultaneously and were revealed with gold-conjugated secondary antibodies. Then samples were fixed in 2% glutaraldehyde in PBS, postfixed with 1% OsO<sub>4</sub>, dehydrated in a graded ethanol series, treated with hexamethyldisilazane (Sigma), air dried and examined using a Hitachi 7500 transmission electron microscope. In the absence of primary antibodies no gold particles were detected. Two independent experiments performed for each condition, gave similar results. Data from the two experiments were pooled for statistical analysis. For resting and stimulated cells, 50 images i.e. 50 μm<sup>2</sup> of plasma membrane sheets were analyzed for each condition [70].

### **Mapping gold particle distributions and statistical analysis**

In order to map gold particle distribution, images of labeled plasma membrane sheets were digitized, and the coordinates of all gold particles in a given area were determined using an Image J plug-in (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) as previously described [36]. To define spatial relationships of two different sizes of gold beads, Ripley's univariate K-function analysis was used where  $L(r) - r$  is calculated for each distance  $r$ , and  $L(r) = (K(r)/\pi)^{1/2}$ , and  $K(r)$  is the Ripley's K function. Analysis of the coordinates indicates whether the gold pattern is clustered, dispersed or random. Colocalization of the two proteins was determined by analyzing the extent to which the two populations of gold particles are clustered with respect to each other. We used an Excel macro written in Visual Basic, kindly provided by JF Hancock.

### **Statistics**

Group data are presented as means ( $\pm$  SEM, as specified in the text and figure legends).

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We would like to thank Dr. N.J. Grant for helpful comments and critically reading the manuscript and T. Thahouly for technical assistance. We are grateful to Drs P. Bocquet, M. Seagar and J. Ayala-Sanmartin for generously providing us with tetanus toxin, GST-VAMP2<sub>1-96</sub> plasmid and S100A10

expressing vector respectively. This work was supported by Agence Nationale de la Recherche, Grant ANR-05-BLAN-0326-01.

### **BIBLIOGRAPHY**

1. Raynal P, Pollard HB: Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1994;1197(1):63-93.
2. Morgan RO, Pilar Fernandez M: Distinct annexin subfamilies in plants and protists diverged prior to animal annexins and from a common ancestor. *J Mol Evol* 1997;44(2):178-88.
3. Gerke V, Moss SE: Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* 2002;82(2):331-71.
4. Moss SE, Morgan RO: The annexins. *Genome Biol* 2004;5(4):219.
5. Gerke V, Creutz CE, Moss SE: Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6(6):449-61.
6. Nakata T, Sobue K, Hirokawa N: Conformational change and localization of calpactin I complex involved in exocytosis as revealed by quick-freeze, deep-etch electron microscopy and immunocytochemistry. *J Cell Biol* 1990;110(1):13-25.
7. Senda T, Okabe T, Matsuda M, Fujita H: Quick-freeze, deep-etch visualization of exocytosis in anterior pituitary secretory cells: localization and possible roles of actin and annexin II. *Cell Tissue Res* 1994;277(1):51-60.
8. Sarafian T, Pradel LA, Henry JP, Aunis D, Bader MF: The participation of annexin II (calpactin I) in calcium-evoked exocytosis requires protein kinase C. *J Cell Biol* 1991;114(6):1135-47.
9. Ali SM, Geisow MJ, Burgoyne RD: A role for calpactin in calcium-dependent exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Nature* 1989;340(6231):313-5.
10. Chasserot-Golaz S, Vitale N, Umbrecht-Jenck E, Knight D, Gerke V, Bader MF: Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Mol Biol Cell* 2005;16(3):1108-19.
11. Robinson IM, Finnegan JM, Monck JR, Wightman RM, Fernandez JM: Colocalization of calcium entry and exocytotic release sites in adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(7):2474-8.

12. Lopez I, Giner D, Ruiz-Nuno A, Fuentealba J, Viniegra S, Garcia AG, Davletov B, Gutierrez LM: Tight coupling of the t-SNARE and calcium channel microdomains in adrenomedullary slices and not in cultured chromaffin cells. *Cell Calcium* 2007;41(6):547-58.
13. Lang T, Bruns D, Wenzel D, Riedel D, Holroyd P, Thiele C, Jahn R: SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *Embo J* 2001;20(9):2202-13.
14. Ohara-Imaizumi M, Nishiwaki C, Kikuta T, Kumakura K, Nakamichi Y, Nagamatsu S: Site of docking and fusion of insulin secretory granules in live MIN6 beta cells analyzed by TAT-conjugated anti-syntaxin 1 antibody and total internal reflection fluorescence microscopy. *J Biol Chem* 2004;279(9):8403-8.
15. Sieber JJ, Willig KI, Heintzmann R, Hell SW, Lang T: The SNARE motif is essential for the formation of syntaxin clusters in the plasma membrane. *Biophys J* 2006;90(8):2843-51.
16. Schafer BW, Heizmann CW: The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci* 1996;21(4):134-40.
17. Johnsson N, Marriott G, Weber K: p36, the major cytoplasmic substrate of src tyrosine protein kinase, binds to its p11 regulatory subunit via a short amino-terminal amphiphatic helix. *Embo J* 1988;7(8):2435-42.
18. Rety S, Sopkova J, Renouard M, Osterloh D, Gerke V, Tabaries S, Russo-Marie F, Lewit-Bentley A: The crystal structure of a complex of p11 with the annexin II N-terminal peptide. *Nat Struct Biol* 1999;6(1):89-95.
19. Renigunta V, Yuan H, Zuzarte M, Rinne S, Koch A, Wischmeyer E, Schlichthorl G, Gao Y, Karschin A, Jacob R, Schwappach B, Daut J, Preisig-Muller R: The retention factor p11 confers an endoplasmic reticulum-localization signal to the potassium channel TASK-1. *Traffic* 2006;7(2):168-81.
20. Svenningsson P, Greengard P: p11 (S100A10)--an inducible adaptor protein that modulates neuronal functions. *Curr Opin Pharmacol* 2007;7(1):27-32.
21. Deora AB, Kreitzer G, Jacovina AT, Hajjar KA: An annexin 2 phosphorylation switch mediates p11-dependent translocation of annexin 2 to the cell surface. *J Biol Chem* 2004;279(42):43411-8.
22. Donato R: S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33(7):637-68.
23. Chasserot-Golaz S, Vitale N, Sagot I, Delouche B, Dirrig S, Pradel LA, Henry JP, Aunis D, Bader MF: Annexin II in exocytosis: catecholamine secretion requires the translocation of p36 to the subplasmalemmal region in chromaffin cells. *J Cell Biol* 1996;133(6):1217-36.
24. Lewit-Bentley A, Rety S, Sopkova-de Oliveira Santos J, Gerke V: S100-annexin complexes: some insights from structural studies. *Cell Biol Int* 2000;24(11):799-802.
25. Santamaria-Kisiel L, Rintala-Dempsey AC, Shaw GS: Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *Biochem J* 2006;396(2):201-14.
26. Quetglas S, Iborra C, Sasakawa N, De Haro L, Kumakura K, Sato K, Leveque C, Seagar M: Calmodulin and lipid binding to synaptobrevin regulates calcium-dependent exocytosis. *Embo J* 2002;21(15):3970-9.
27. Papini E, Rossetto O, Cutler DF: Vesicle-associated membrane protein (VAMP)/synaptobrevin-2 is associated with dense core secretory granules in PC12 neuroendocrine cells. *J Biol Chem* 1995;270(3):1332-6.
28. Verhofstad AA, Coupland RE, Parker TR, Goldstein M: Immunohistochemical and biochemical study on the development of the noradrenaline- and adrenaline-storing cells of the adrenal medulla of the rat. *Cell Tissue Res* 1985;242(2):233-43.
29. Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, Rossetto O, Polverino de Laureto P, DasGupta BR, Montecucco C: Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* 1992;359(6398):832-5.
30. Hohne-Zell B, Ecker A, Weller U, Gratzl M: Synaptobrevin cleavage by the tetanus toxin light chain is linked to the inhibition of exocytosis in chromaffin cells. *FEBS Lett* 1994;355(2):131-4.
31. Prior IA, Parton RG, Hancock JF: Observing cell surface signaling domains using electron microscopy. *Sci STKE* 2003;2003(177):PL9.
32. Wilson BS, Pfeiffer JR, Oliver JM: Observing FcepsilonRI signaling from the inside of the mast cell membrane. *J Cell Biol* 2000;149(5):1131-42.

33. Wilson BS, Pfeiffer JR, Surviladze Z, Gaudet EA, Oliver JM: High resolution mapping of mast cell membranes reveals primary and secondary domains of Fc(epsilon)RI and LAT. *J Cell Biol* 2001;154(3):645-58.
34. Lillemeier BF, Pfeiffer JR, Surviladze Z, Wilson BS, Davis MM: Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(50):18992-7.
35. Prior IA, Muncke C, Parton RG, Hancock JF: Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J Cell Biol* 2003;160(2):165-70.
36. Zhang J, Leiderman K, Pfeiffer JR, Wilson BS, Oliver JM, Steinberg SL: Characterizing the topography of membrane receptors and signaling molecules from spatial patterns obtained using nanometer-scale electron-dense probes and electron microscopy. *Micron* 2006;37(1):14-34.
37. Philimonenko AA, Janacek J, Hozak P: Statistical evaluation of colocalization patterns in immunogold labeling experiments. *J Struct Biol* 2000;132(3):201-10.
38. Parmryd I, Adler J, Patel R, Magee AI: Imaging metabolism of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in T-cell GM1-enriched domains containing Ras proteins. *Exp Cell Res* 2003;285(1):27-38.
39. Aoyagi K, Sugaya T, Umeda M, Yamamoto S, Terakawa S, Takahashi M: The activation of exocytotic sites by the formation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate microdomains at syntaxin clusters. *J Biol Chem* 2005;280(17):17346-52.
40. Salaun C, James DJ, Chamberlain LH: Lipid rafts and the regulation of exocytosis. *Traffic* 2004;5(4):255-64.
41. James DJ, Khodthong C, Kowalchuk JA, Martin TF: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates SNARE-dependent membrane fusion. *J Cell Biol* 2008;182(2):355-66.
42. Rescher U, Gerke V: Annexins—unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci* 2004;117(Pt 13):2631-9.
43. Chamberlain LH, Burgoyne RD, Gould GW: 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* 2001;98(10):5619-24.
44. Rescher U, Gerke V: S100A10/p11: family, friends and functions. *Pflugers Arch* 2007.
45. Okuse K, Malik-Hall M, Baker MD, Poon WY, Kong H, Chao MV, Wood JN: Annexin II light chain regulates sensory neuron-specific sodium channel expression. *Nature* 2002;417(6889):653-6.
46. Girard C, Tinel N, Terrenoire C, Romey G, Lazdunski M, Borsotto M: p11, an annexin II subunit, an auxiliary protein associated with the background K+ channel, TASK-1. *Embo J* 2002;21(17):4439-48.
47. Svenningsson P, Chergui K, Rachleff I, Flajolet M, Zhang X, El Yacoubi M, Vaugeois JM, Nomikos GG, Greengard P: Alterations in 5-HT1B receptor function by p11 in depression-like states. *Science* 2006;311(5757):77-80.
48. Sampo B, Kaech S, Kunz S, Banker G: Two distinct mechanisms target membrane proteins to the axonal surface. *Neuron* 2003;37(4):611-24.
49. Thiel C, Osborn M, Gerke V: The tight association of the tyrosine kinase substrate annexin II with the submembranous cytoskeleton depends on intact p11- and Ca(2+)-binding sites. *J Cell Sci* 1992;103 ( Pt 3):733-42.
50. Wu T, Angus CW, Yao XL, Logun C, Shelhamer JH: P11, a unique member of the S100 family of calcium-binding proteins, interacts with and inhibits the activity of the 85-kDa cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 1997;272(27):17145-53.
51. Bailleux A, Wendum D, Audubert F, Jouniaux AM, Koumanov K, Trugnan G, Masliah J: Cytosolic phospholipase A2-p11 interaction controls arachidonic acid release as a function of epithelial cell confluence. *Biochem J* 2004;378(Pt 2):307-15.
52. Connell E, Darios F, Broersen K, Gatsby N, Peak-Chew SY, Rickman C, Davletov B: Mechanism of arachidonic acid action on syntaxin-Munc18. *EMBO Rep* 2007;8(4):414-9.
53. Martin TF, Loyet KM, Barry VA, Kowalchuk JA: The role of PtdIns(4,5)P2 in exocytotic membrane fusion. *Biochem Soc Trans* 1997;25(4):1137-41.
54. Holz RW, Axelrod D: Localization of phosphatidylinositol 4,5-P(2) important in exocytosis and a quantitative analysis of chromaffin granule motion adjacent to the plasma membrane. *Ann N Y Acad Sci* 2002;971:232-43.

55. Milosevic I, Sorensen JB, Lang T, Krauss M, Nagy G, Haucke V, Jahn R, Neher E: Plasmalemmal phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate level regulates the releasable vesicle pool size in chromaffin cells. *J Neurosci* 2005;25(10):2557-65.
56. Hayes MJ, Merrifield CJ, Shao D, Ayala-Sanmartin J, Schorey CD, Levine TP, Proust J, Curran J, Bailly M, Moss SE: Annexin 2 binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on endocytic vesicles is regulated by the stress response pathway. *J Biol Chem* 2004;279(14):14157-64.
57. Rescher U, Ruhe D, Ludwig C, Zobiack N, Gerke V: Annexin 2 is a phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding protein recruited to actin assembly sites at cellular membranes. *J Cell Sci* 2004;117(Pt 16):3473-80.
58. Menke M, Ross M, Gerke V, Steinem C: The molecular arrangement of membrane-bound annexin A2-S100A10 tetramer as revealed by scanning force microscopy. *ChemBiochem* 2004;5(7):1003-6.
59. Hayes MJ, Rescher U, Gerke V, Moss SE: Annexin-actin interactions. *Traffic* 2004;5(8):571-6.
60. Rintala-Dempsey AC, Santamaria-Kisiel L, Liao Y, Lajoie G, Shaw GS: Insights into S100 target specificity examined by a new interaction between S100A11 and annexin A2. *Biochemistry* 2006;45(49):14695-705.
61. Timmons PM, Chan CT, Rigby PW, Poirier F: The gene encoding the calcium binding protein calyculin is expressed at sites of exocytosis in the mouse. *J Cell Sci* 1993;104 ( Pt 1):187-96.
62. Sandelin M, Zabihi S, Liu L, Wicher G, Kozlova EN: Metastasis-associated S100A4 (Mts1) protein is expressed in subpopulations of sensory and autonomic neurons and in Schwann cells of the adult rat. *J Comp Neurol* 2004;473(2):233-43.
63. Grant NJ, Konig F, Deloulme JC, Aunis D, Langley K: Noradrenergic, but not Adrenergic Chromaffin Cells in the Adrenal Gland Express Neuromodulin (GAP-43). *Eur J Neurosci* 1992;4(12):1257-1263.
64. Masiakowski P, Shooter EM: Changes in PC12 cell morphology induced by transfection with 42C cDNA, coding for a member of the S-100 protein family. *J Neurosci Res* 1990;27(3):264-9.
65. Gokhale NA, Abraham A, Digman MA, Gratton E, Cho W: Phosphoinositide specificity of and mechanism of lipid domain formation by annexin A2-p11 heterotetramer. *J Biol Chem* 2005;280(52):42831-40.
66. Pollard HB, Creutz CE, Fowler V, Scott J, Pazoles CJ: Calcium-dependent regulation of chromaffin granule movement, membrane contact, and fusion during exocytosis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1982;46 , 2:819-34.
67. Perrin D, Aunis D: Reorganization of alpha-fodrin induced by stimulation in secretory cells. *Nature* 1985;315(6020):589-92.
68. Ayala-Sanmartin J, Gouache P, Henry JP: N-Terminal domain of annexin 2 regulates Ca(2+)-dependent membrane aggregation by the core domain: a site directed mutagenesis study. *Biochemistry* 2000;39(49):15190-8.
69. Quetglas S, Leveque C, Miquelis R, Sato K, Seagar M: Ca2+-dependent regulation of synaptic SNARE complex assembly via a calmodulin- and phospholipid-binding domain of synaptobrevin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(17):9695-700.
70. Wilson BS, Steinberg SL, Liederman K, Pfeiffer JR, Surviladze Z, Zhang J, Samelson LE, Yang LH, Kotula PG, Oliver JM: Markers for detergent-resistant lipid rafts occupy distinct and dynamic domains in native membranes. *Mol Biol Cell* 2004;15(6):2580-92.

## LEGENDES:

### Figure 1: S100A10 interacts with annexin-A2 in stimulated chromaffin cells

**A)** Immunocytochemical distribution of annexin-A2, S100A10 and SNAP25 in resting (**R**) and nicotine-stimulated (**S**) chromaffin cells. Cells were stained with monoclonal anti-SNAP25 antibodies revealed with secondary Alexa 555-anti-mouse antibodies, postfixed and incubated with rabbit polyclonal anti-annexin-A2 and monoclonal anti-S100A10 antibodies revealed with Alexa 488-anti-rabbit and Alexa 647-anti-mouse antibodies, respectively. Images were recorded in the same optical section by a triple exposure procedure. Masks generated by selecting the double-labelled pixels represent the regions of co-localization. Bars = 5µm

**B)** Chemical cross-linking experiments in resting and stimulated chromaffin cells revealed proteins interacting with S100A10. Cells permeabilized in the absence or presence of 20 µM Ca<sup>2+</sup> were treated with 2mM DSS (+) or DMSO (-) for 30 min. Cross-linked products were analyzed by Western blot with anti-S100A10 (left panel) or anti-annexin-A2 (right panel) antibodies.

### Figure 2: S100A10 interacts with VAMP2 *in vitro*

**A)** GST or GST-VAMP2<sub>1-96</sub> coated glutathione-sepharose beads were incubated with the indicated amounts of S100A10, washed and then subjected to gel electrophoresis and immuno-blotting using anti-GST, anti-VAMP2 and anti-S100A10 antibodies.

**B)** GST-VAMP2<sub>1-96</sub> conjugated glutathione-sepharose beads were incubated with 3 µg of S100A10 and the indicated amounts of calmodulin in the presence or absence of 1 mM calcium. Beads were then washed and subjected to gel electrophoresis and immuno-detection on nitrocellulose using anti-S100A10 antibodies.

### Figure 3: Intracellular distribution of VAMP2 in chromaffin cells

**A)** Fractions (40 µg of protein per fraction) collected from a continuous sucrose density gradient layered with the crude chromaffin membrane pellet were subjected to Western blot analysis using anti-VAMP2, anti-SNAP-25 (plasma membrane marker) and anti-chromogranin A (CGA; chromaffin granule marker) antibodies.

**B)** Double immunofluorescence confocal micrographs of chromaffin cells labelled with anti-VAMP2 antibodies and either anti-CGA or anti-PNMT antibodies. Mask generated by selecting the double-labelled pixels represent the regions of co-localization.

**C)** Confocal image of chromaffin cells triple-labelled with anti-S100A10, anti-PNMT and anti-CGA antibodies. Bars = 5µm in B and C.

### Figure 4: Effect of tetanus toxin on the distribution of S100A10 and annexin-A2 in chromaffin cells

**A)** Crude membranes prepared from stimulated chromaffin cells were treated with tetanus toxin light chain (160 nM), centrifuged to separate membrane associated proteins (P) from soluble proteins (S), and then analyzed by Western blot using anti-annexin-A2, anti-S100A10 and anti-VAMP2 antibodies.

**B)** Confocal micrographs of permeabilized chromaffin cells treated or not with tetanus toxin, fixed, and labelled with S100A10 antibodies. Bars = 5µm

**C)** Double immunofluorescence assay for annexin-A2 translocation and exocytosis in chromaffin cells. SLO-permeabilized chromaffin cells were incubated for 10 min with 150 nM tetanus toxin and then maintained in resting condition without calcium or stimulated for 6 min with 20 µM free Ca<sup>2+</sup>, in the presence of DBH antibodies to detect exocytotic sites. After fixation, cells were labelled with anti-annexin-A2 antibodies. Images were recorded in the same optical section by a double exposure procedure. Bar = 5µm **D)** Histogram showing the percentage of cells displaying a peripheral labelling of annexin-A2. For each experimental condition, 200 cells were counted in randomly selected areas (± SEM, n = 3).

### Figure 5: Distribution of S100A10, VAMP2 and syntaxin on plasma membrane sheets visualized by immunogold labelling and electron microscopy

**A)** Membrane topography of S100A10 (6-nm gold particles, squares) and VAMP2 (10-nm gold particles, circles) after immunogold labelling of the inner face of the plasma membrane prepared from resting chromaffin cells. Membrane sheets were labelled with goat polyclonal antibodies anti-S100A10 and monoclonal antibodies anti-VAMP2, and revealed with secondary antibodies coupled to 6- and 10-nm gold particles respectively. Bar: 100 nm.

**(B)** Higher magnification of the clusters containing both S100A10 and VAMP2 gold particles. Bars = 50 nm.

**C)** Immunogold clustering characterized by Ripley's K-function analysis. Values of L(r)-r above the 95% confidence interval (C.I.) indicate significant clustering within the defined x-axis radius values (r), values <-1 indicate dispersal at the radius and no deviation outside C.I. indicates a random pattern. Thus S100A10 and VAMP2 co-cluster on plasma membrane sheets of resting chromaffin cells.

**D)** Membrane topography of S100A10 (10-nm gold particles, squares) and syntaxin (15-nm gold particles, circles) on plasma membrane fragments prepared from resting chromaffin cells. Bar: 100 nm.

**E)** Higher magnification of the clusters containing both S100A10 and syntaxin gold particles. Bars: 50 nm.

**F)** Spatial point pattern analysis. Ripley's K-function analysis shows that S100A10 and syntaxin co-cluster on the plasma membrane of resting chromaffin cells.

**Figure 6: Annexin-A2 is present at S100A10-syntaxin plasma membrane clusters in stimulated chromaffin cells**

**A)** Double staining experiment for S100A10 (10-nm gold particles) and annexin-A2 (15-nm gold particles) or **B)** syntaxin (6-nm gold particles) and annexin-A2 (10-nm gold particles) on plasma membrane sheets obtained from nicotine-stimulated chromaffin cells. Scale bar: 100 nm. Inserts show enlarged views of the regions delimited with a square with typical aggregates containing both sizes of gold particle. Bars: 50 nm.

**Figure 7: PIP<sub>2</sub> domains are formed at the level of the S100A10 clusters upon cell stimulation.**

Double staining experiment for S100A10 (10-nm gold particles) and PIP<sub>2</sub> (6-nm gold particles) on plasma membrane sheets prepared from resting (**A, C**) and stimulated (**B, D**) chromaffin cells. Bar: 100 nm. **C, D** show higher magnifications of the regions delimited with a square containing typical clusters of both sizes of gold particles. Bars = 50 nm.

**E)** Spatial point pattern analysis of PIP<sub>2</sub> labelling. Values of L(r)-r above the 95% C.I. indicate significant clustering in stimulated condition whereas no deviation outside C.I. indicates a random pattern on the plasma membrane of resting chromaffin cells.

**F)** Bivariate K-function analysis of the double-labelled samples. Values of L(r)-r above the 95% C.I. indicate significant co-clustering of PIP<sub>2</sub> and S100A10 in resting and stimulated conditions, but they co-localize in larger 120-nm microdomains in stimulated chromaffin cells.

**G)** The histogram represents the relative distribution of PIP<sub>2</sub> clusters in function of their distance from the border of granules. The distance and the number of clusters were determined manually. Data are the mean values ( $\pm$  SD, n = 2) of two experiments and for each experiment 30 images were analysed. Note that PIP<sub>2</sub> clusters are concentrated close to docked granules (within 50nm).

**H)** The histogram represents the relative distribution of 6-nm gold particles in function of their distance from granule. The distance and the number of particles have been determined manually, as described in Fig 7E. Note that PIP<sub>2</sub>-bound particles are concentrated close to the granule border. An insignificant number of PIP<sub>2</sub>-bound particles are located under the granules (less than 25 nm from their borders).

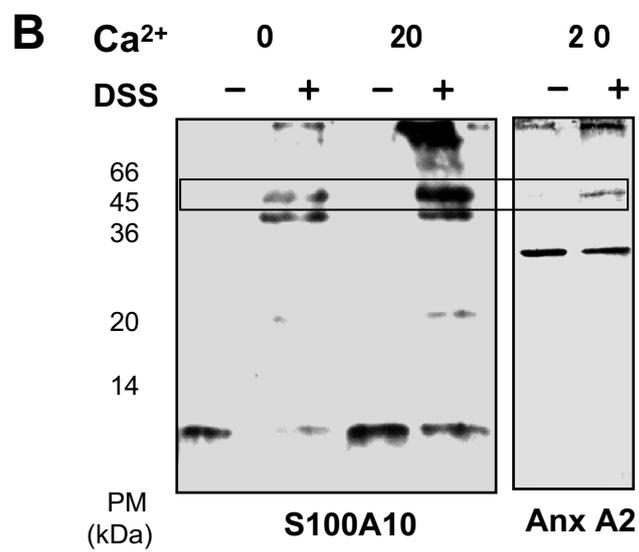
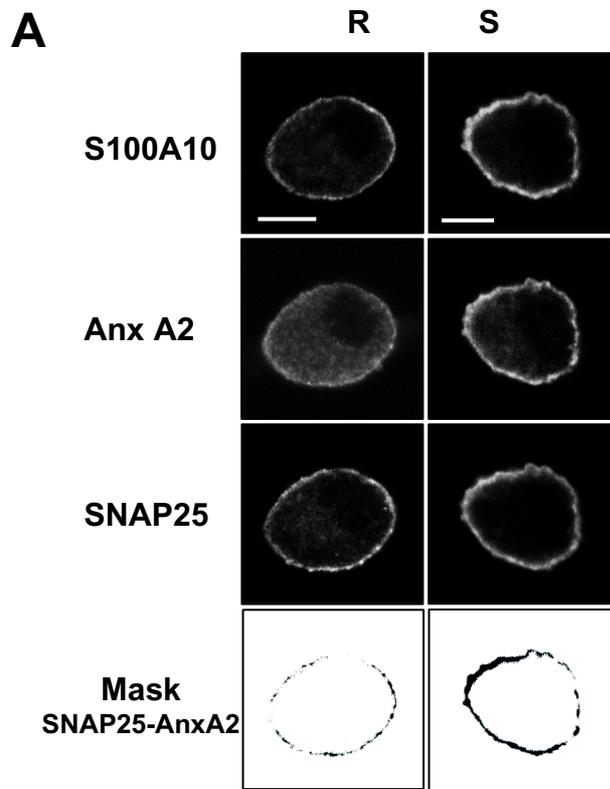


Figure 1

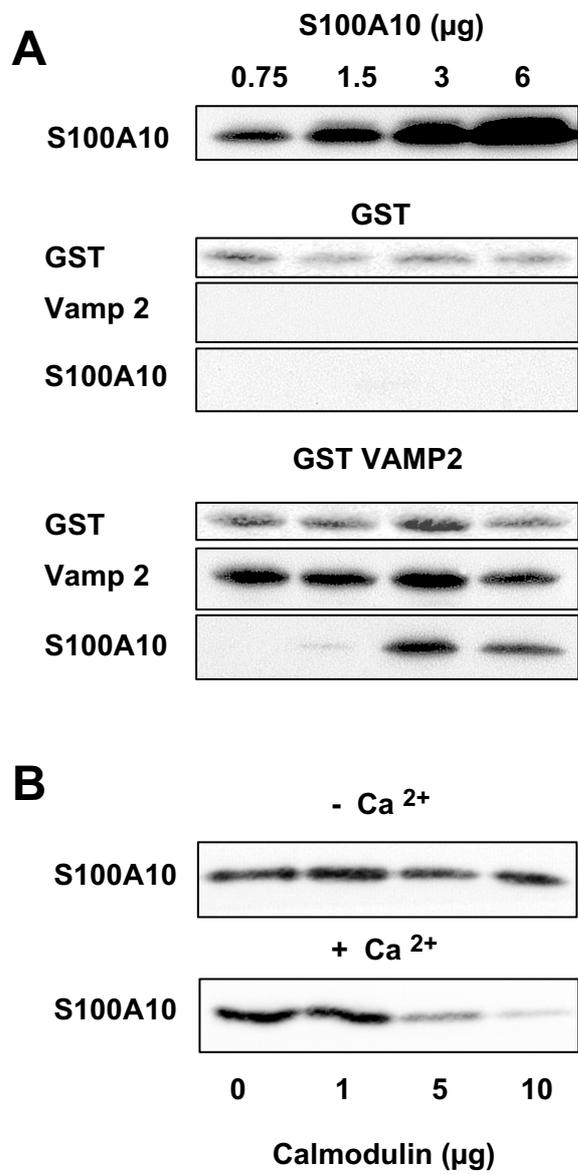
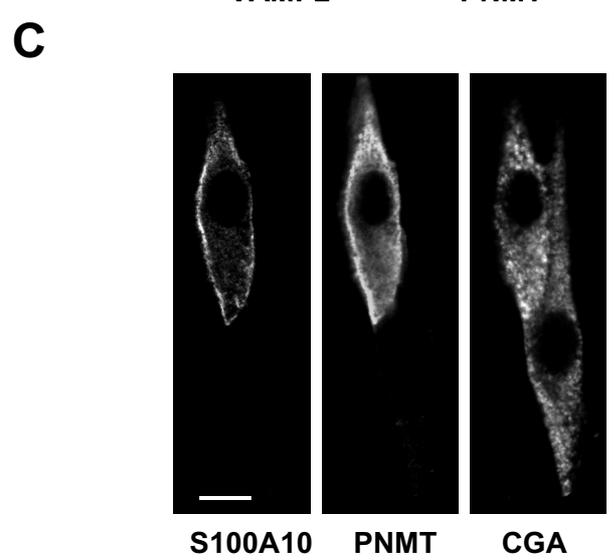
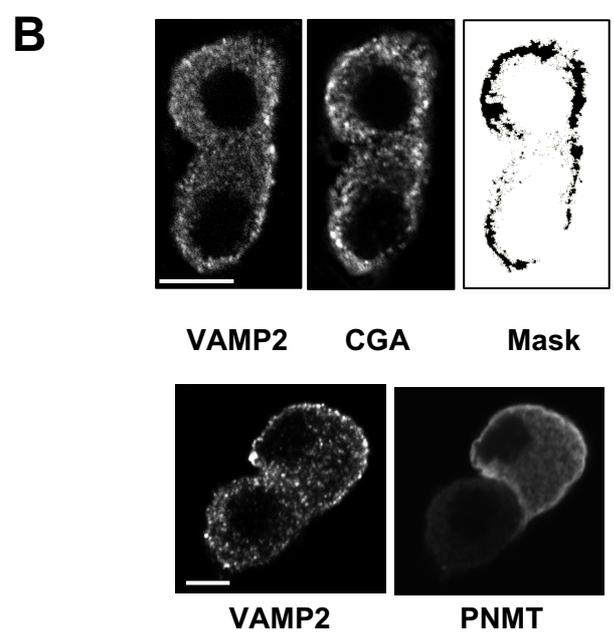
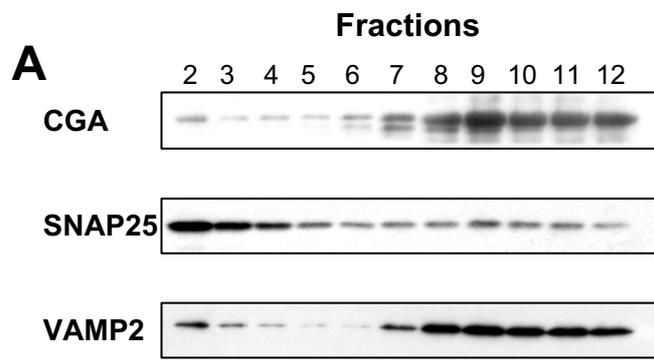


Figure 2



**Figure 3**

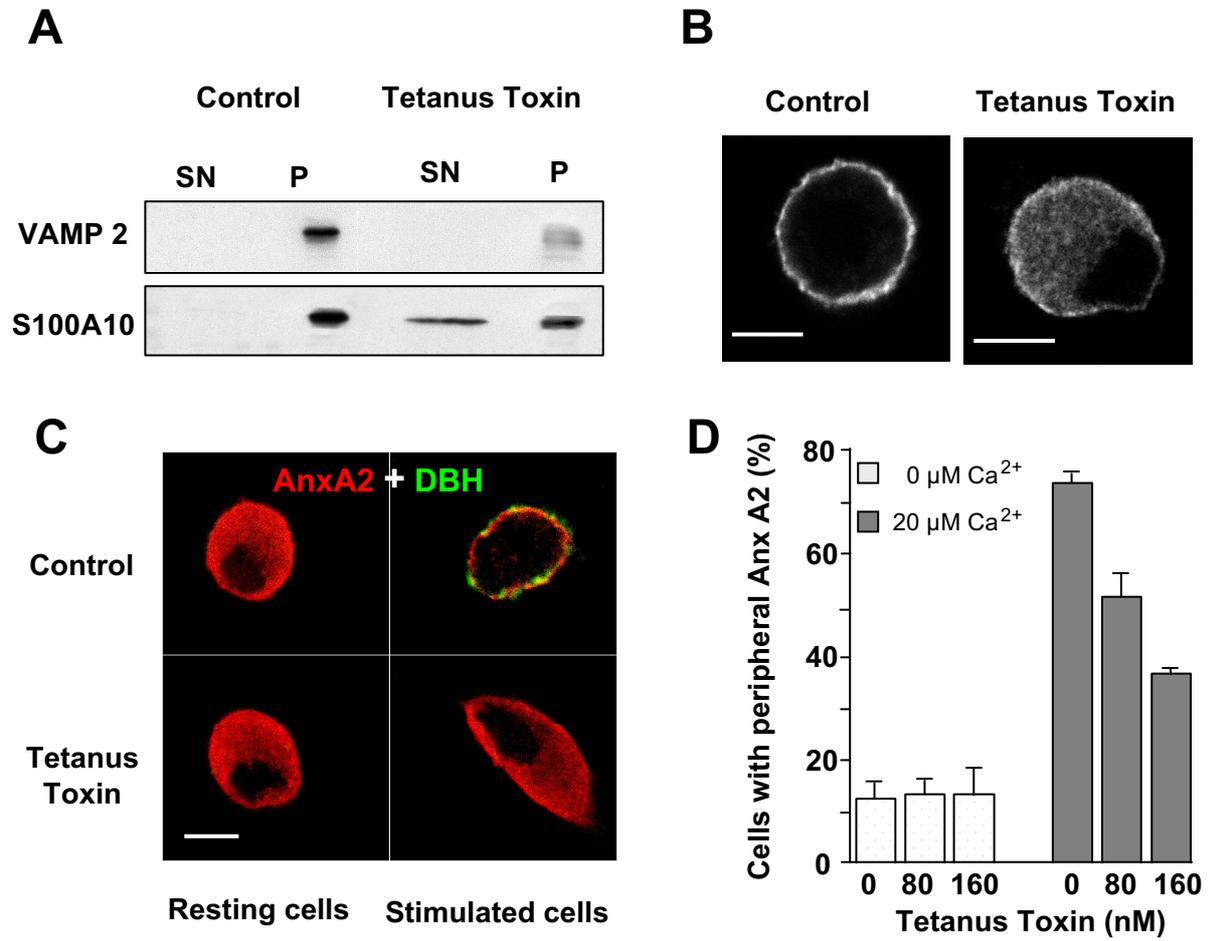


Figure 4

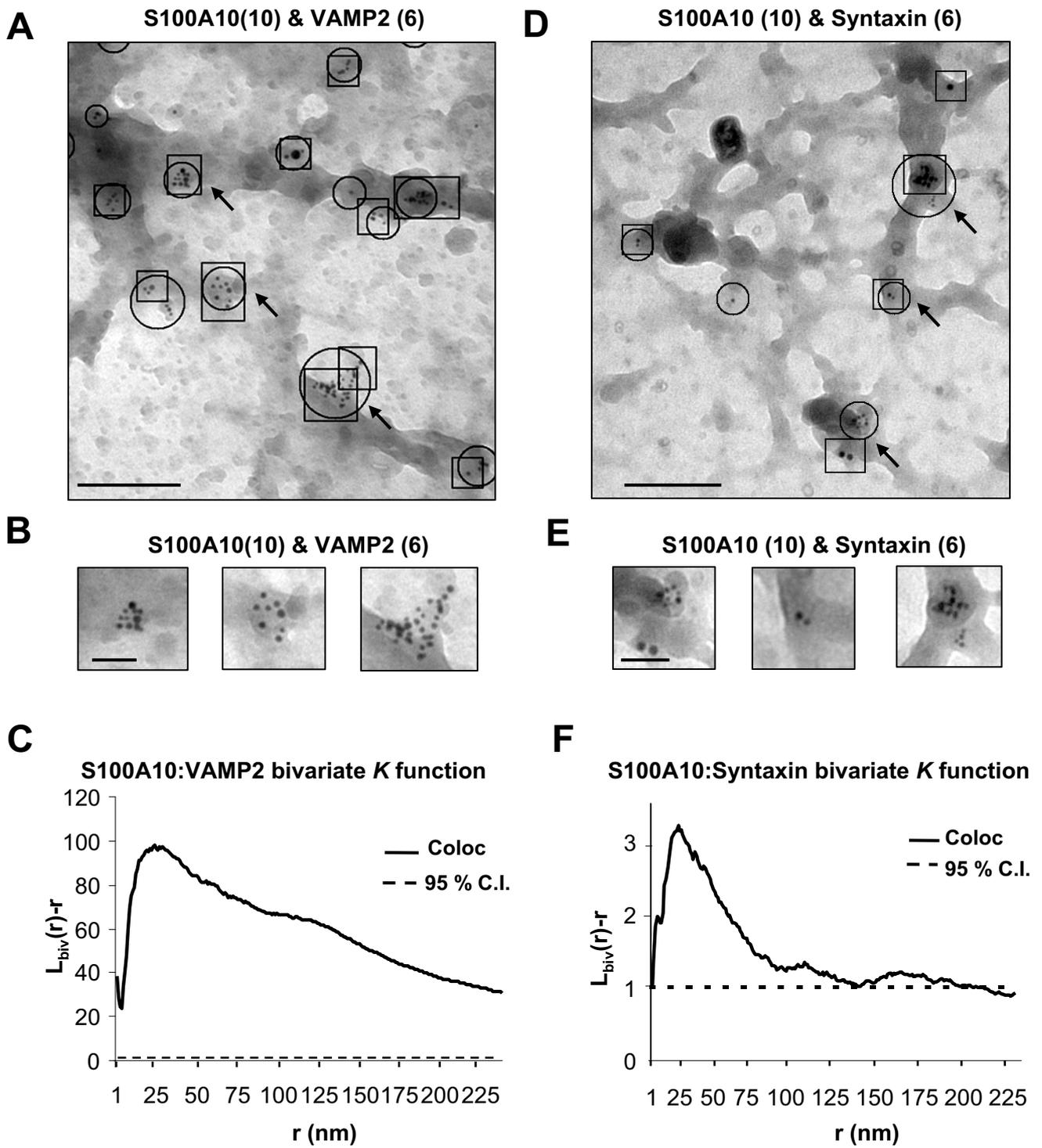
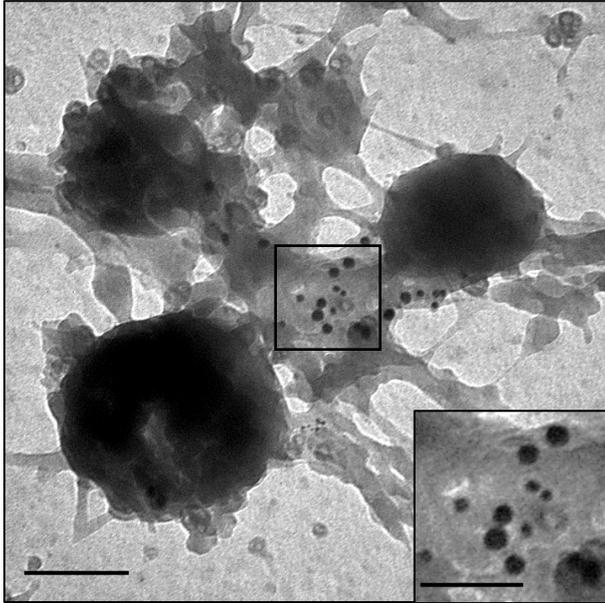


Figure 5

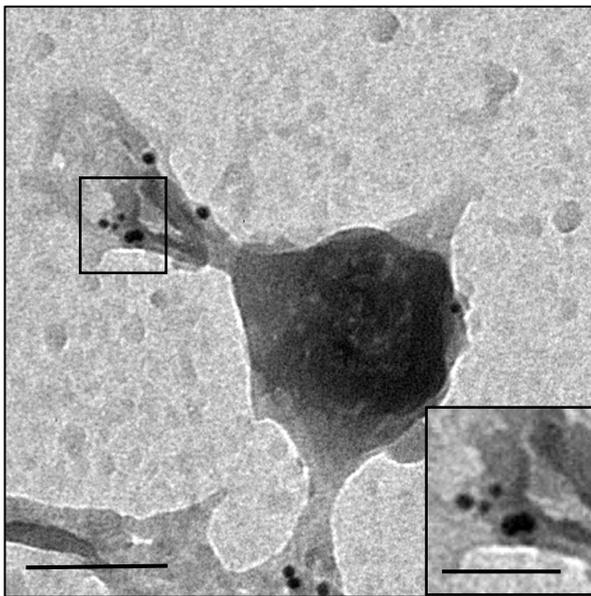
**A**

**S100A10 (10) & Anx A2 (15)**



**B**

**Syntaxin (6) & Anx A2 (10)**



**Figure 6**

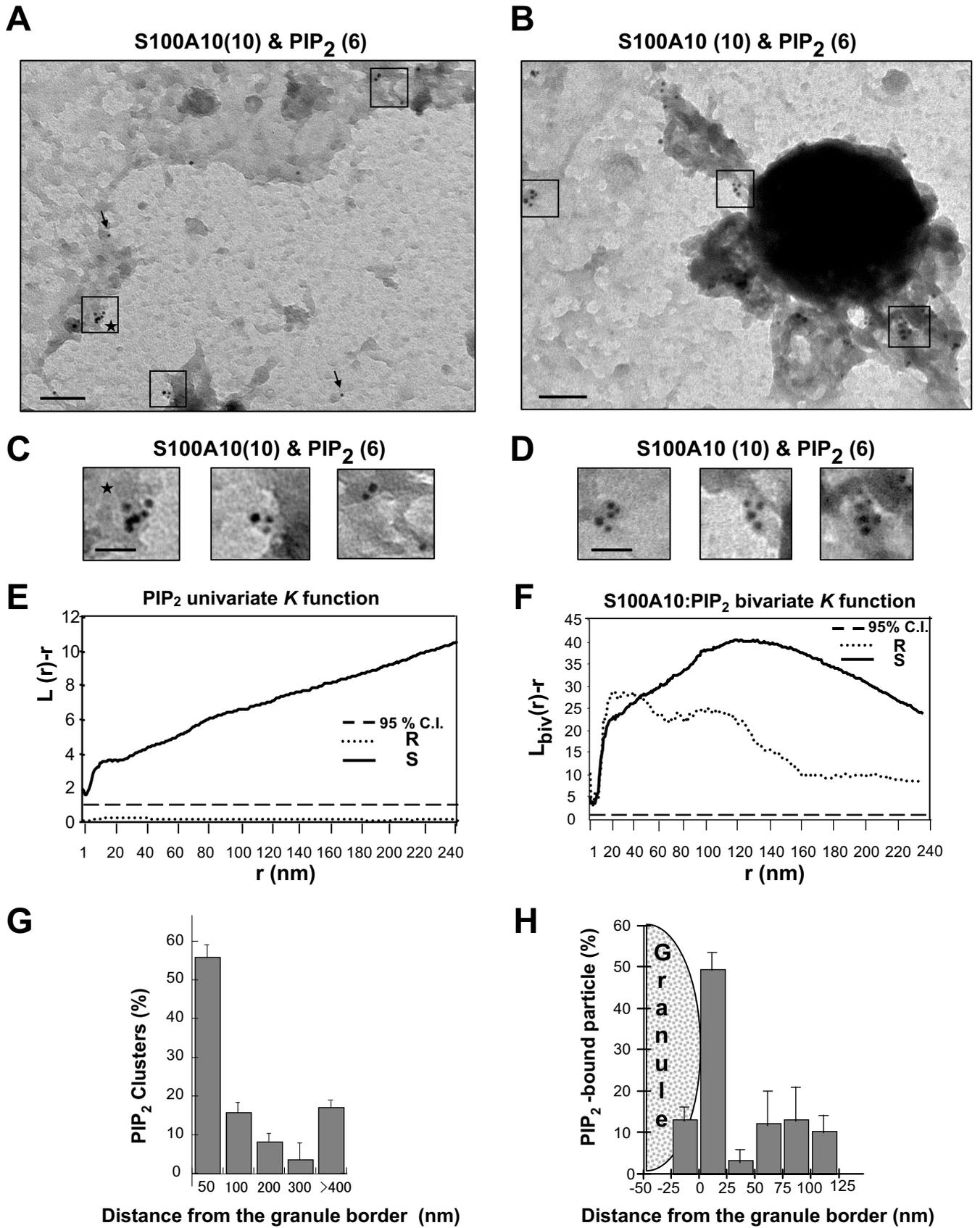


Figure 7



### III) Discussion

Le rôle et la distribution de l'annexine A2 et de son ligand S100A10 avait été étudié précédemment, et il avait été montré que l'annexine A2 est présente dans le cytoplasme, alors que S100A10 est présente exclusivement dans la région subplasmalemmale (Chasserot-Golaz et al., 1996). La stimulation par un sécrétagogue provoque la colocalisation des deux protéines sous la membrane plasmique et la formation de l'annexine A2 hétérotétramérique près des sites d'exocytose. En réduisant l'expression de l'annexine A2 fonctionnelle dans les cellules chromaffines, nous avons montré que la présence d'annexine A2 à la périphérie cellulaire est un prérequis pour l'arrimage et subséquemment la fusion des granules de sécrétion avec la membrane plasmique. De plus, nos résultats suggèrent que la translocation de l'annexine A2 à la membrane plasmique induit la formation de microdomaines lipidiques nécessaires à l'exocytose (Chasserot-Golaz et al., 2005). En effet, les constituants de la machinerie d'exocytose tels que la syntaxine, la SNAP25 et VAMP2 doivent être associés avec ces radeaux pour former des complexes efficaces permettant l'arrimage des granules chromaffines à la membrane plasmique (Chamberlain et al., 2001; Lang et al., 2001; Salaun et al., 2004a). Ainsi la question qui s'impose est de savoir comment l'annexine A2 est recrutée près des protéines SNARE pour former des microdomaines lipidiques au bon endroit. Considérant que S100A10 est localisée à la périphérie des cellules chromaffines et qu'elle est capable d'assurer un lien entre certaines protéines transmembranaires et l'annexine A2 (Rescher and Gerke, 2007), nous avons recherché des partenaires protéiques de S100A10 dans les cellules chromaffines. Grâce à des expériences de réticulation chimique, à la précipitation de protéines fusionnées à la GST, et à l'utilisation de toxine tétanique, nous avons mis en évidence une nouvelle interaction directe entre S100A10 et VAMP2, qui se produit aussi bien dans les cellules chromaffines qu'*in vitro* en utilisant des protéines recombinantes. De plus, nous avons montré que cette interaction a une importance fonctionnelle dans le recrutement de l'annexine A2 à la membrane plasmique.

S100A10 a été longtemps considérée comme une simple protéine de structure du tétramère d'annexine A2, mais des observations récentes ont changé cette vision puisque S100A10 a été décrite comme un régulateur direct d'un certain nombre de protéines cellulaires, en particulier de certains récepteurs et canaux de la membrane plasmique (Svenningsson and Greengard, 2007). En effet, dans les cellules, S100A10 se trouve

majoritairement sous la forme d'un complexe hétérotétramérique avec l'annexine A2 et dirige ce complexe vers des cibles membranaires spécifiques. Récemment, des interactions entre S100A10 et plusieurs protéines de la membrane plasmique ont été mises en évidence, et dans la plupart des cas, S100A10, probablement en complexe avec l'annexine A2, régulerait le trafic intracellulaire de la protéine cible et donc sa localisation à la membrane plasmique (Rescher and Gerke, 2007). Dans les cellules chromaffines, il semble que S100A10, grâce à son interaction avec VAMP2, recrute l'annexine A2 au niveau de domaines de protéines SNARE préexistants. Ce recrutement pourrait induire la formation de microdomaines lipidiques requis pour le fonctionnement efficace des complexes SNARE (Chamberlain et al., 2001; Chasserot-Golaz et al., 2005), mais également constituer un senseur calcique. En effet, l'exocytose dans les cellules chromaffines adrénergiques et noradrénergiques se produit avec des affinités pour le calcium qui semblent corrélées à l'expression de S100A10 : ainsi, la sécrétion dans les cellules adrénergiques exprimant S100A10 nécessite une concentration calcique 10 fois plus faible que dans les cellules noradrénergiques ne contenant pas S100A10 (Chasserot-Golaz et al., 1996).

La présence de VAMP2 à la membrane plasmique des cellules chromaffines adrénergiques pourrait être une conséquence de son interaction avec S100A10, qui serait capable d'inhiber son endocytose et ainsi d'augmenter sa rétention dans la membrane plasmique. Un tel mécanisme a été décrit par Sampo et coll. (Sampo et al., 2003) lors de la polarisation axonale dans les neurones. Ces auteurs ont montré que VAMP2 est amenée à la surface des axones comme des membranes, mais que son endocytose se produit préférentiellement à partir des membranes dendritiques ; dans les axones, des interactions avec des protéines spécifiques ancrées au cytosquelette sous-membranaire pourraient empêcher l'entrée de VAMP2 dans les vésicules à clathrine et augmenter ainsi sa rétention dans la membrane plasmique.

La présence de S100A10 uniquement dans les cellules noradrénergiques pose la question suivante : quel est le ligand auprès duquel l'annexine A2 transloque lors de la stimulation de l'exocytose dans les cellules noradrénergiques ? Dans la mesure où l'annexine A2 est une protéine capable de lier les phospholipides de manière dépendante du calcium, elle pourrait s'associer directement à la bicouche lipidique de la membrane plasmique dans les cellules noradrénergiques stimulées. Alternativement, il a été montré que d'autres protéines de la famille S100, telles que S100A6 (Filipek et al., 1991) ou S100A11 (Rintala-Dempsey et al.,

2006) interagissent avec l'annexine A2 en présence de calcium, et semblent impliqués dans les voies de signalisation calciques sous-tendant l'exocytose dans des types cellulaires variés (Niki et al., 1997). D'autres expériences seront nécessaires pour déterminer la présence d'autres protéines de la famille S100 dans les cellules chromaffines. De plus, une interaction directe entre SNAP23 et l'annexine A2 nécessitant une concentration importante de calcium a été récemment décrite dans les cellules alvéolaires de type II (Wang et al., 2007) et SNAP23 est présente dans les cellules chromaffines noradrénergiques (Grant et al., 1999), il est donc tentant d'imaginer que l'annexine A2 puisse être recrutée près des protéines SNARE par ce type d'interaction dans les cellules noradrénergiques.

En conclusion, nous avons mis en évidence un couplage important entre S100A10/annexine A2 et VAMP2. Nos résultats indiquent que **S100A10, en interagissant avec VAMP2, pourrait recruter l'annexine A2 qui jouerait un rôle de senseur calcique, d'organisateur de la membrane et/ou de protéine fusiogène** (Regnouf et al., 1995). De plus, l'annexine A2 étant capable de compartimenter la membrane plasmique (Babychuk and Draeger, 2000; Chasserot-Golaz et al., 2005) et par là même de participer à l'organisation spatiotemporelle des protéines nécessaires à l'arrimage et à la fusion, elle serait une protéine cruciale pour le bon déroulement du processus exocytotique. Il est intéressant de noter que l'interaction dépendante du calcium de l'annexine A2 avec la membrane plasmique pourrait permettre un lien entre le contrôle spatial du processus de sécrétion régulée et l'activation de récepteurs de surface ainsi que la signalisation calcique dans les cellules.



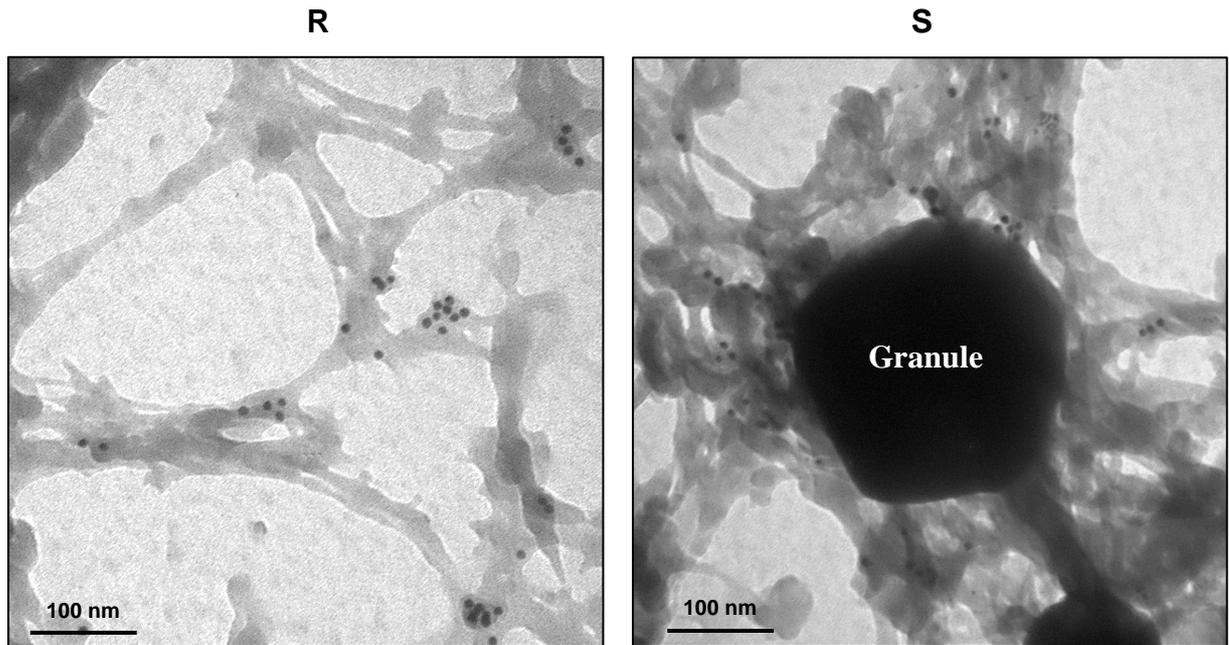
## C. Par quel mécanisme l'annexine A2 forme-t-elle les microdomaines lipidiques ?

### I) Introduction

Pour poursuivre l'étude du rôle de l'annexine A2 au cours de l'exocytose, j'ai cherché à savoir comment cette protéine pouvait former les microdomaines lipidiques. Plusieurs hypothèses étaient envisageables : soit la liaison de l'annexine A2 aux lipides ainsi que sa multimérisation seraient à la base d'un recrutement latéral des différents composants des microdomaines lipidiques (Menke et al., 2005; Ross et al., 2003), soit l'annexine A2 utiliserait d'autres partenaires moléculaires pour y parvenir, comme l'actine, qui intervient à différents niveaux au cours de l'exocytose (Hayes et al., 2004b).

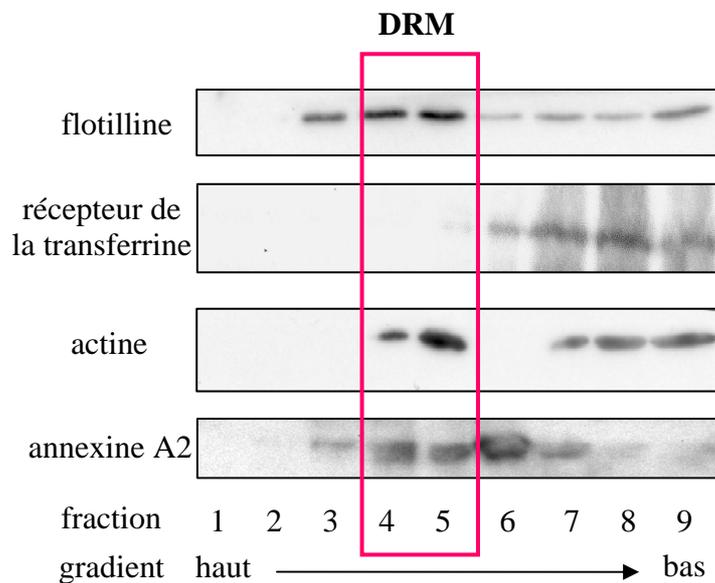
Ce dernier mode d'action a retenu notre attention. En effet, dans de nombreux modèles cellulaires, l'annexine A2 est présente au niveau de structures dynamiques incluant actine et membranes, comme les comètes d'actine des macropinosomes (Merrifield et al., 2001) ou les structures d'actine formées aux sites d'attachement de bactéries *E. coli* entéropathogènes sur les cellules infectées (Zobiack et al., 2002). Nous avons donc recherché la participation de l'actine dans la formation des microdomaines lipidiques.

Pour cela, j'ai tout d'abord regardé si l'actine était présente au niveau des granules arrimés à la membrane plasmique, puis j'ai étudié son association aux radeaux par des techniques biochimiques ainsi que par microscopie confocale et électronique. Pour déterminer le rôle fonctionnel de l'actine sur la formation des microdomaines lipidiques, j'ai utilisé la latrunculine B, drogue dépolymérisant les filaments d'actine. Finalement, j'ai recherché à l'aide d'une seconde drogue, la withaférine A, si l'annexine A2 pouvait participer à l'organisation des filaments d'actine pour former des microdomaines lipidiques.



**Figure 23 : Des structures d'actine sont présentes autour des granules chromaffines arrimés à la membrane plasmique des cellules.**

Les cellules sont maintenues au repos ou stimulées avec une solution de nicotine à 20  $\mu\text{M}$  à 37°C pendant 10 min, puis des feuilletts de membrane plasmique sont réalisés, fixés et marqués avec des anticorps anti-actine. Les marquages sont révélés grâce à des anticorps secondaires couplés à des billes d'or de 10 nm.



**Figure 24 : L'actine est associée aux DRM de cellules stimulées.**

Les cellules sont stimulées avec du Locke normal contenant 20  $\mu\text{M}$  de nicotine pendant 5 min à 37°C. Après traitement au Triton-X100 pendant 30 min à 4°C, les DRM sont isolés sur un gradient d'Optiprep<sup>TM</sup>. La flotilline, le récepteur de la transferrine et l'actine sont détectées dans les différentes fractions par électrophorèse et immunoréplique.

## **II) Résultats**

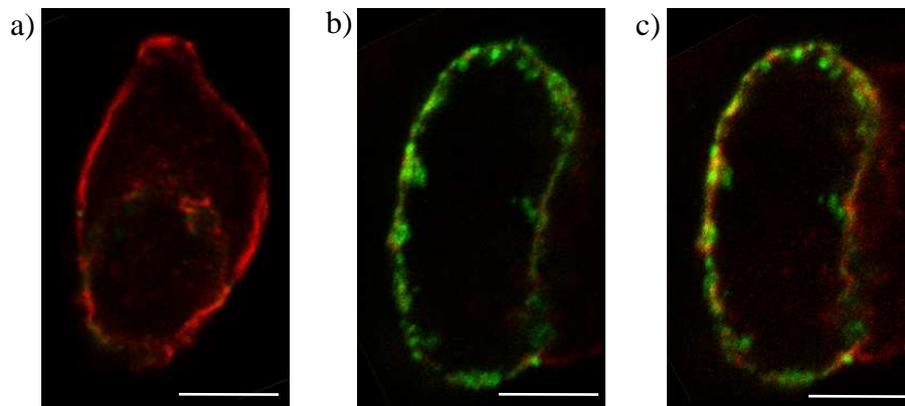
### **1) Il existe des structures d'actine au niveau des granules arrimés**

La première étape de cette étude consistait donc à déterminer si la localisation de l'actine pouvait lui permettre de participer à la formation des microdomaines lipidiques par l'annexine A2. Nous avons observé en microscopie confocale que, lors d'une stimulation, la dépolymérisation du cytosquelette d'actine sous-plasmalemmal n'est pas totale. En effet, il subsiste des filaments d'actine marqués par la phalloïdine dans les cellules stimulées. J'ai donc cherché à observer l'organisation ultrastructurale de cette actine résiduelle en microscopie électronique sur des feuillettes de membrane plasmique de cellules au repos ou stimulées (figure 23). Dans les cellules au repos, il existe des structures grisées filamenteuses formant un maillage lâche apposé à la membrane plasmique. Ces structures sont marquées par les anticorps anti-actine, et sont donc au moins en partie constituées de filaments d'actine. Dans les cellules stimulées, on peut noter la présence d'un granule très dense aux électrons arrimé à la membrane. Autour de ce granule, on trouve des structures d'actine formant un réseau plus resserré que dans les cellules au repos. Ces structures denses d'actine pouvaient donc jouer un rôle au cours du processus exocytotique et participer à la formation des microdomaines lipidiques. Nous avons donc recherché la présence d'actine dans les microdomaines lipidiques par des expériences de biochimie.

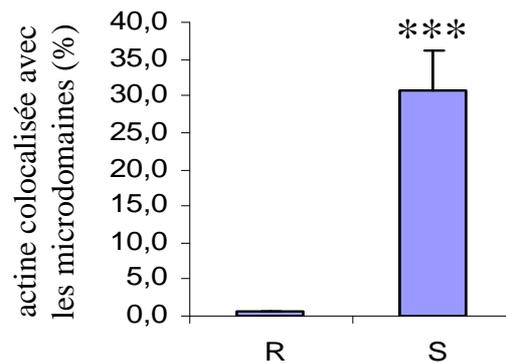
### **2) L'actine est associée aux microdomaines lipidiques enrichis en GM1 dans les cellules stimulées**

Dans ce but, j'ai réalisé une séparation de DRM de cellules stimulées sur un gradient de densité, puis j'ai recherché la présence d'actine dans les différentes fractions (figure 24). Les fractions contenant les DRM sont identifiées par la présence de la flotilline, marqueur protéique de microdomaines lipidiques, et par l'absence du récepteur de la transferrine, présent à la membrane plasmique mais exclu des microdomaines. L'actine est associée en partie aux fractions contenant le récepteur de la transferrine, mais aussi aux fractions contenant les DRM (fractions 4 et 5).

**A**



**B**



**Figure 25 : L'actine colocalise avec les microdomaines lipidiques.**

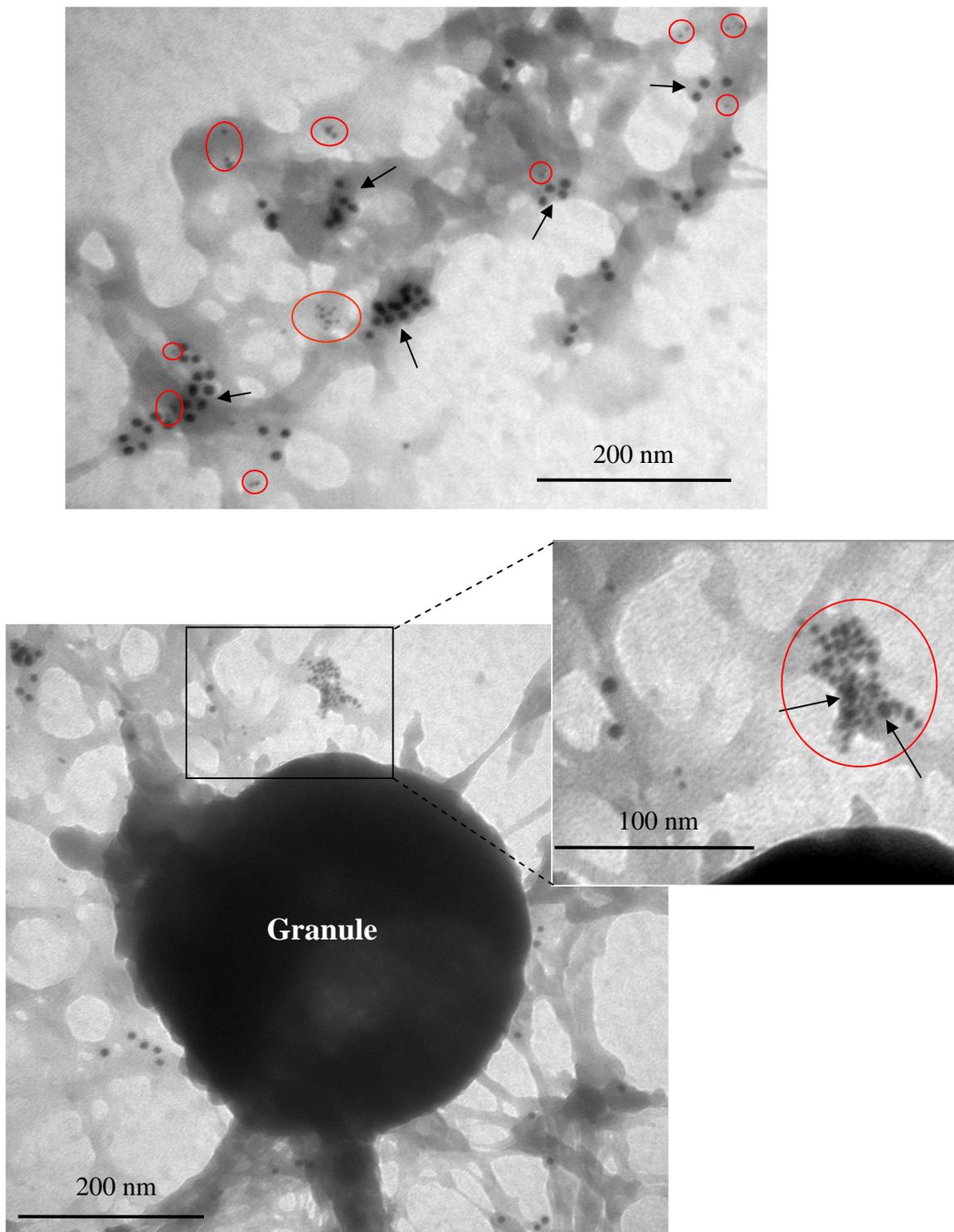
**A** Les cellules sont maintenues au repos (**a**) ou stimulées (**b**, **c**) avec une solution de nicotine pendant 5 minutes à 37°C, en présence de toxine cholérique couplée à l'Alexa-488. Après fixation, l'actine est visualisée à l'aide de phalloïdine couplée à la rhodamine. Les images sont acquises au microscope confocal par double exposition de la même section optique. Les images a et b sont prises avec des réglages identiques, alors que l'image c est obtenue en augmentant la sensibilité des photomultiplicateurs dans le rouge pour observer l'actine résiduelle.

**B** L'histogramme représente le pourcentage d'actine colocalisant avec la toxine cholérique. Les données sont exprimées en valeurs moyennes  $\pm$  SEM (n=25 cellules). \*\*\*p<0,001 (test t de Student). Des résultats similaires ont été obtenus dans trois expériences indépendantes.

Pour confirmer ce résultat, nous avons réalisé des expériences de cytochimie couplées à la microscopie confocale. Nous avons cherché la présence d'actine au niveau des microdomaines lipidiques en effectuant un comarquage du GM1 par la toxine cholérique et de l'actine par la phalloïdine (figure 25). Dans les cellules au repos, la toxine cholérique se lie faiblement à la membrane plasmique, et un réseau d'actine sous-cortical est clairement visible. La stimulation entraîne une augmentation de la quantité de toxine cholérique fluorescente liée et une dépolymérisation du réseau d'actine, mais des structures d'actine subsistent au niveau de la membrane plasmique quand on augmente la sensibilité de détection du microscope. Ce marquage est présent majoritairement au niveau des microdomaines lipidiques visualisés par la toxine cholérique, comme l'atteste la présence de pixels jaunes. J'ai effectué une évaluation semi-quantitative de cette colocalisation en déterminant le nombre de pixels jaunes par rapport au nombre de pixels correspondant à la phalloïdine. Dans les cellules au repos, le pourcentage de colocalisation est faible,  $0,6\% \pm 0,1$ , alors que dans les cellules stimulées, il est largement augmenté,  $30,6\% \pm 5,5$ . Ainsi, l'actine subsistant après stimulation dans ces cellules est en grande partie présente dans les microdomaines lipidiques.

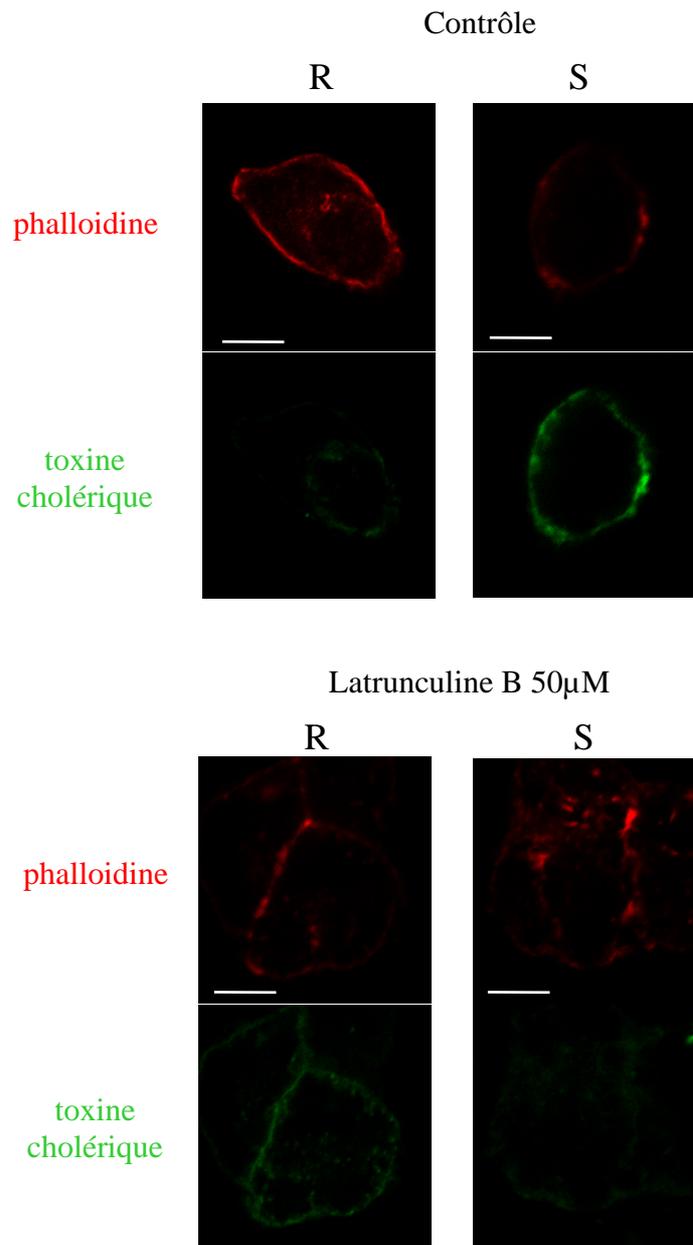
Pour caractériser l'association de cette actine résiduelle avec les microdomaines lipidiques à l'échelle ultrastructurale, nous avons réalisé une étude par microscopie électronique à transmission sur des feuilletts de membrane plasmique de cellules stimulées, sur lesquels nous avons effectué des doubles marquages de l'actine et du GM1 (figure 26). Dans ces cellules, les structures grisées filamenteuses, décorées avec des billes de 10 nm, sont au moins en partie constituées d'actine. Des amas de billes de 6 nm, correspondant à la toxine cholérique, sont également visibles et semblent associés aux points de contact entre les filaments et la membrane.

Ces résultats montrent la présence d'actine au niveau des microdomaines lipidiques dans les cellules stimulées. Nous avons donc recherché si ces filaments d'actine pouvaient intervenir dans la formation des microdomaines.



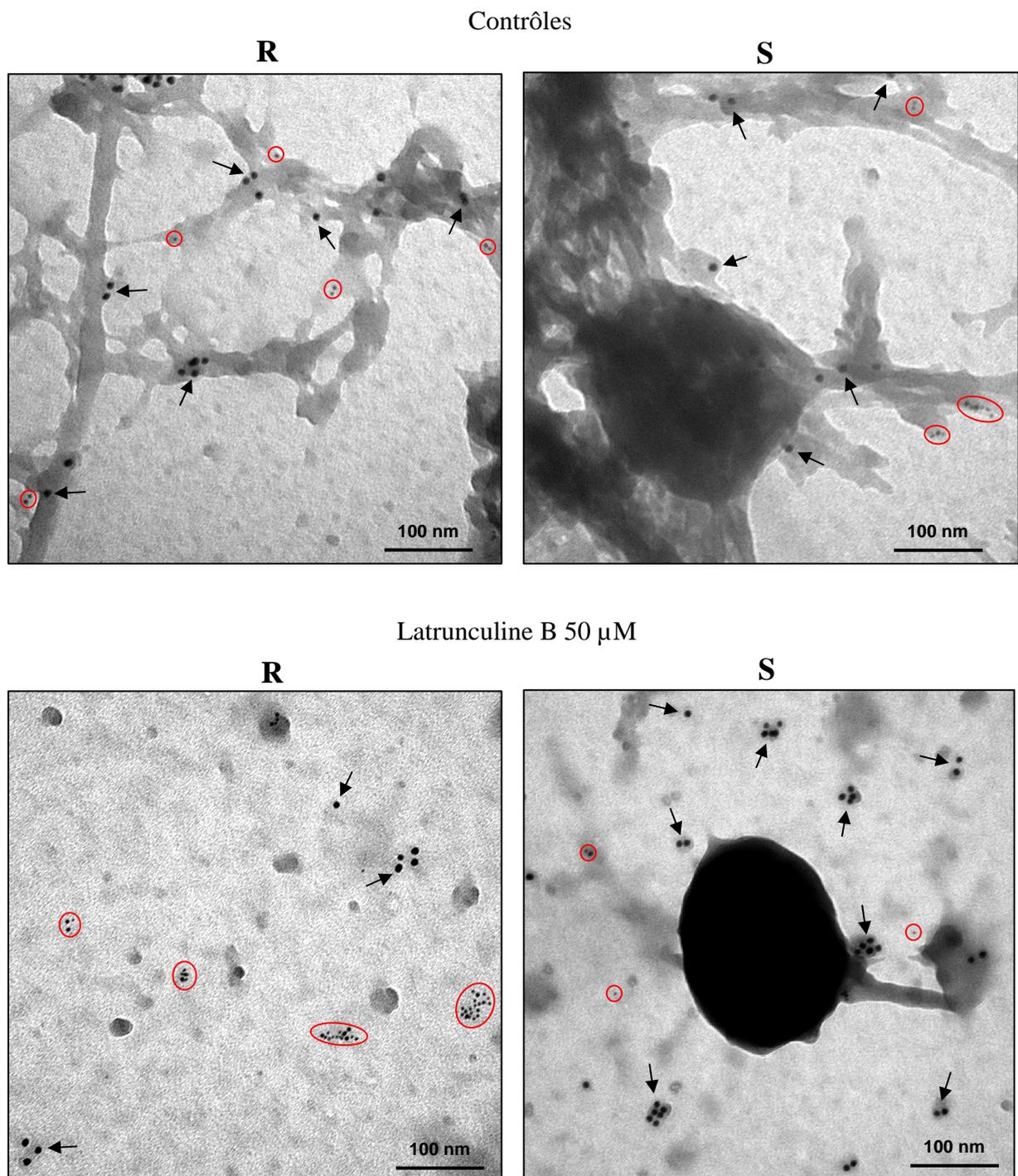
**Figure 26 : L'actine est présente au niveau des microdomaines lipidiques formés au point d'ancrage des granules.**

Les cellules sont stimulées avec une solution de nicotine à 20  $\mu\text{M}$  à 37°C pendant 10 min en présence de toxine cholérique biotinylée, puis les feuillettes de membrane plasmique sont préparés, fixés et incubés avec un anticorps anti-actine. Les marquages sont révélés respectivement grâce à la streptavidine ou à un anticorps secondaire couplés à des billes d'or de 6 nm (toxine cholérique, cercles) ou de 10 nm (actine, flèches).



**Figure 27 : La latrunculine B inhibe la formation de microdomaines lipidiques dans les cellules chromaffines stimulées.**

Les cellules sont traitées avec une solution de latrunculine B à 50  $\mu$ M pendant 1 h à 37°C, puis maintenues au repos ou stimulées pendant 10 min à 37°C à la nicotine 20  $\mu$ M en présence de toxine cholérique couplée à l'Alexa 488. Après fixation, l'actine est marquée par la phalloïdine couplée à la rhodamine. Les images sont acquises au microscope confocal avec les mêmes paramètres d'acquisition. Barres de taille : 5  $\mu$ m.



**Figure 28 : Effet de la latrunculine B sur l'actine filamenteuse présente autour des granules dockés et sur la coalescence des microdomaines lipidiques.**

Les cellules sont traitées avec une solution de latrunculine B à 50  $\mu$ M pendant 1 h à 37°C, puis maintenues au repos ou stimulées avec de la nicotine à 20  $\mu$ M pendant 10 min à 37°C en présence de toxine cholérique biotinylée. Après préparation de feuillettes de membrane plasmique et fixation, un marquage avec un anticorps anti-actine est réalisé. La révélation est faite grâce à la streptavidine couplée à des billes d'or de 6 nm (toxine cholérique, cercles) et à un anticorps secondaire couplé à des billes de 10 nm (actine, flèches).

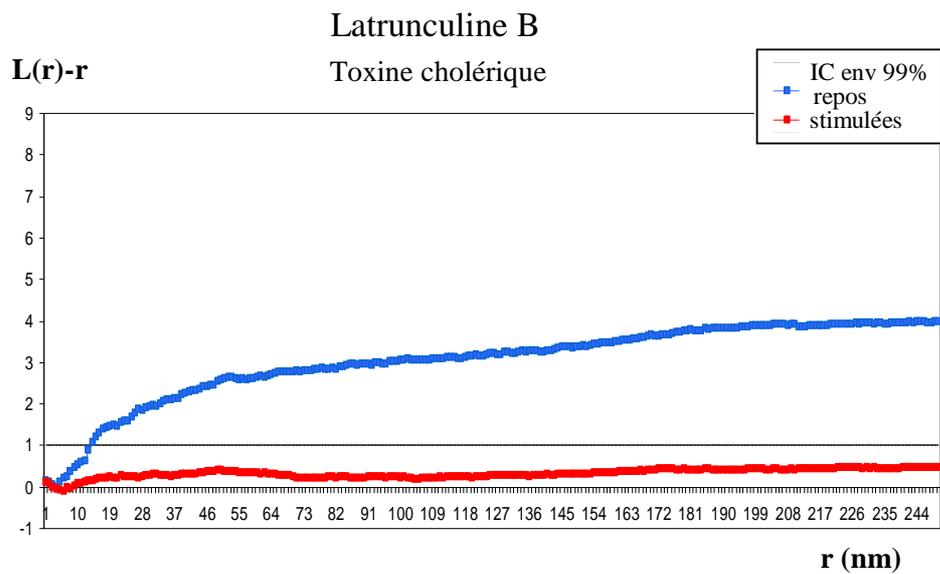
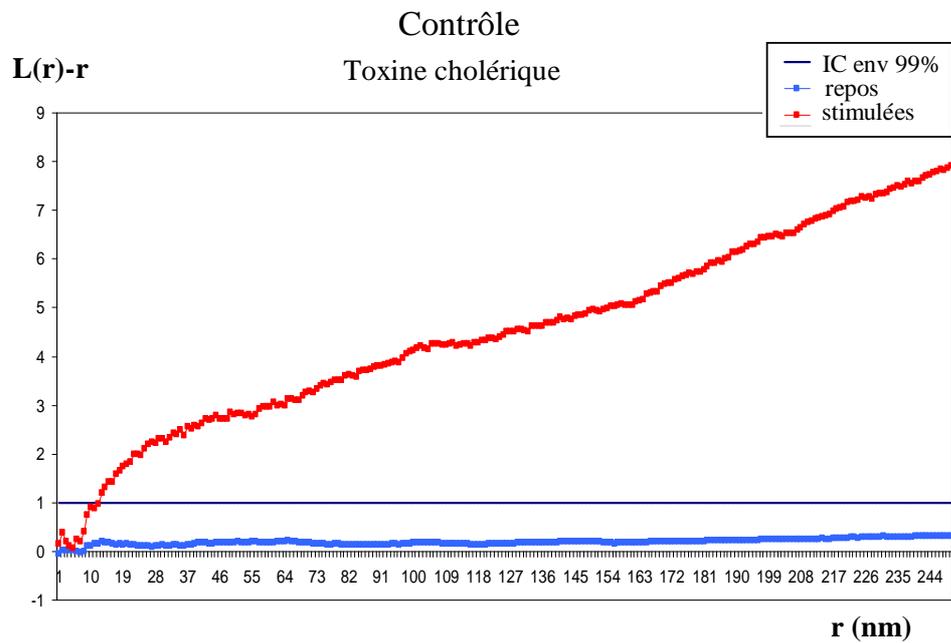
### **3) L'actine est nécessaire à la formation des microdomaines lipidiques**

J'ai donc cherché à voir si la dépolymérisation de l'actine par une drogue, la latrunculine B, pouvait interférer avec la formation de microdomaines.

Une première étude a été faite en microscopie confocale (figure 27). Un double marquage de l'actine et du GM1 a été réalisé sur des cellules traitées à la latrunculine B à 50  $\mu$ M, concentration qui inhibe l'exocytose (Gasman et al., 2004). Dans les cellules au repos, le traitement à la latrunculine B entraîne le morcellement du cytosquelette d'actine sous-cortical et il y a une légère augmentation du marquage par la toxine cholérique. Sous l'effet de la latrunculine B, la toxine cholérique ne se lie plus à la membrane plasmique des cellules stimulées.

Pour visualiser cela à l'échelle ultrastructurale, nous avons utilisé la microscopie électronique à transmission sur des feuilletts de membrane plasmique (figure 28). Le traitement à la latrunculine B entraîne la disparition des structures filamenteuses grisées : donc ces structures contiennent des filaments d'actine ou sont régulés par ces filaments. Dans les cellules traitées par cette drogue, on observe, au repos, des amas de billes correspondant à la toxine cholérique, alors que ces billes sont isolées dans les cellules stimulées. De plus, le traitement à la latrunculine B inhibe la colocalisation des deux types de billes dans les cellules au repos comme stimulées. Pour évaluer de manière quantitative l'effet de la latrunculine B sur la formation des microdomaines lipidiques, j'ai utilisé une analyse statistique de la distribution des billes sur les images de microscopie électronique par la fonction K univariée de Ripley (figure 29). Dans les cellules contrôles au repos, les billes sont réparties de façon aléatoire, alors qu'elles sont organisées en agrégats dans les cellules stimulées. Le traitement à la latrunculine B provoque une inversion de ce phénomène, c'est à dire une apparition d'amas de billes dans les cellules au repos, alors qu'ils ne sont pas formés dans les cellules stimulées. Ceci confirme nos observations en microscopie photonique.

L'actine pourrait donc jouer un double rôle dans l'organisation de la membrane plasmique : au repos les filaments d'actine formeraient des mailles qui maintiendraient les nanodomaines lipidiques séparés les uns des autres et empêcheraient leur regroupement spontané au sein des membranes ; dans les cellules stimulées, des structures d'actine auraient un rôle plus dynamique et permettraient la coalescence des nanodomaines ainsi que la stabilisation des microdomaines lipidiques.



**Figure 29 : Analyse statistique de l'effet de la latrunculine B sur la coalescence des microdomaines lipidiques.**

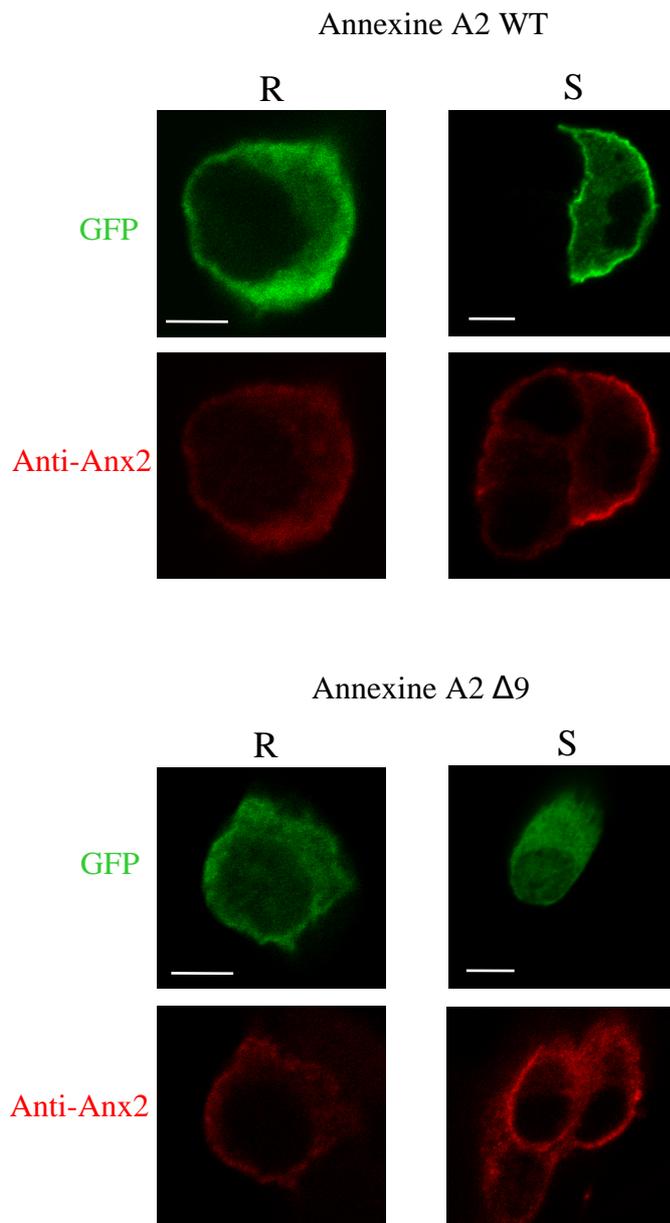
Analyse statistique de la formation de clusters de toxine cholérique dans les cellules stimulées traitées ou non à la latrunculine B à 50  $\mu\text{M}$ , par analyse de la distribution spatiale des billes grâce à la fonction K de Ripley. Pour  $-1 < L(r)-r < 1$ , les billes sont considérées comme réparties aléatoirement, pour  $L(r)-r > 1$ , les billes sont considérées comme formant des clusters.

#### **4) La fasciculation de l'actine par l'annexine A2 participerait à la formation des radeaux lipidiques au niveau des sites d'exocytose.**

J'ai ensuite cherché à savoir si l'annexine A2 agissait sur ces structures d'actine pour former les microdomaines lipidiques, car elle est capable de lier et de réticuler des filaments d'actine lorsqu'elle est sous forme hétérotétramérique (Filipenko and Waisman, 2001; Jones et al., 1992).

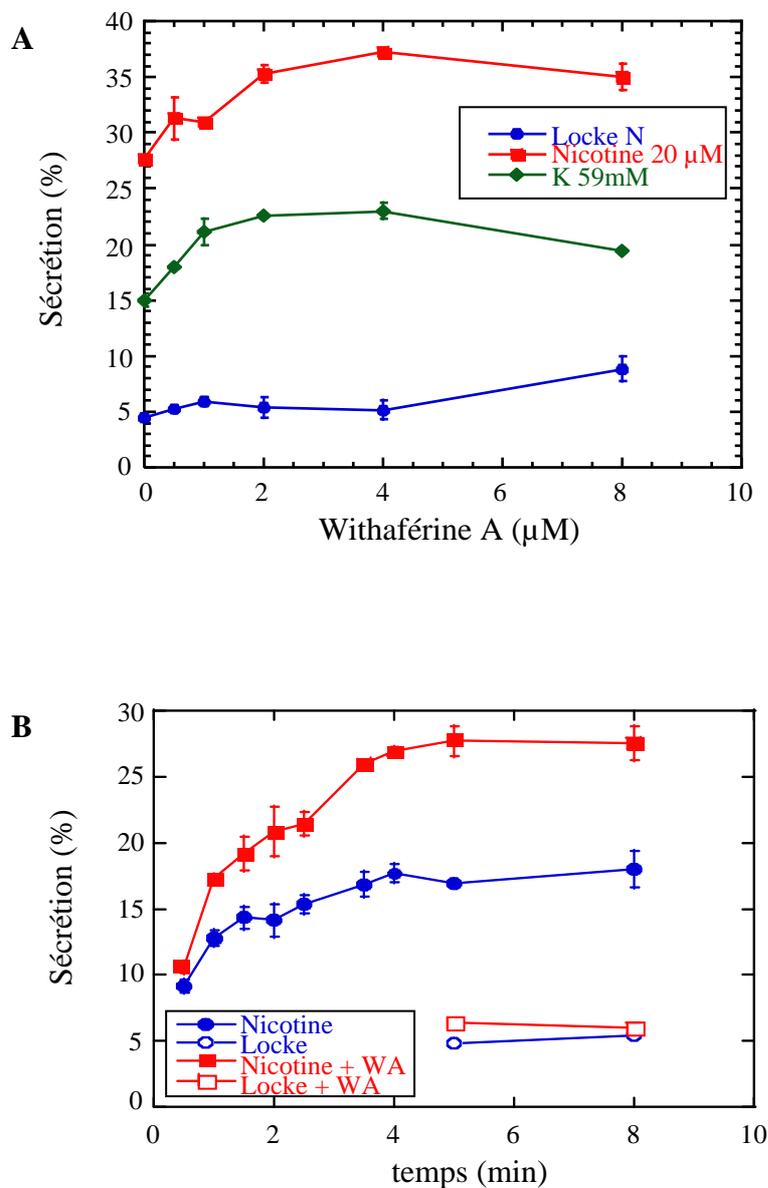
Ma première idée était de tester l'effet de mutants de l'annexine A2 incapables de lier l'actine sur la formation de microdomaines lipidiques (Filipenko and Waisman, 2001). Dans un premier temps, j'ai donc généré deux mutants délétés des 9 et 16 derniers acides aminés en position C-terminale, à partir de l'annexine A2 fusionnée à la GFP (WT). Après transfection des cellules chromaffines avec ces différentes constructions, j'ai observé le comportement de ces mutants dans les cellules au repos ou stimulées. La localisation des différentes protéines a été étudiée au microscope confocal (figure 30). L'annexine A2-GFP colocalise avec l'annexine A2 endogène dans le cytoplasme des cellules au repos et transloque à la périphérie cellulaire dans les cellules stimulées. Les mutants qui ne lient plus l'actine sont cytosoliques dans les cellules au repos, mais ne transloquent plus lors de la stimulation. Ceci suggère que la liaison de l'annexine A2 à l'actine est nécessaire à son maintien dans l'espace subplasmalemmal. De plus, ces mutants n'inhibent pas la translocation de l'annexine A2 endogène ni l'exocytose. Pour déterminer l'implication de la modification de filaments d'actine par l'annexine A2 dans la formation des microdomaines lipidiques, nous avons donc utilisé une drogue qui stimule spécifiquement l'activité de fasciculation des filaments d'actine par l'annexine A2, la withaférine A (Falsey et al., 2006). Cette drogue est un stéroïde lactone naturel produit par un certain nombre de plantes de la famille des solanacées dont *Withania somnifera* (Mishra et al., 2000). Elle est surtout utilisée pour ses propriétés anticancéreuses, liées à sa capacité à inhiber la migration des cellules tumorales et l'angiogenèse (Bargagna-Mohan et al., 2007; Falsey et al., 2006). J'ai donc étudié l'effet de la withaférine A sur la sécrétion des catécholamines, sur la modification du réseau d'actine, et finalement sur la formation des microdomaines lipidiques.

Pour déterminer l'effet de la withaférine A sur l'exocytose induite par différents sécrétagogues, nous avons mesuré la sécrétion de noradrénaline tritiée par des cellules chromaffines traitées avec différentes concentrations de withaférine A (figure 31A). Lors du traitement, le taux de sécrétion est augmenté dans les cellules stimulées par la nicotine ou par



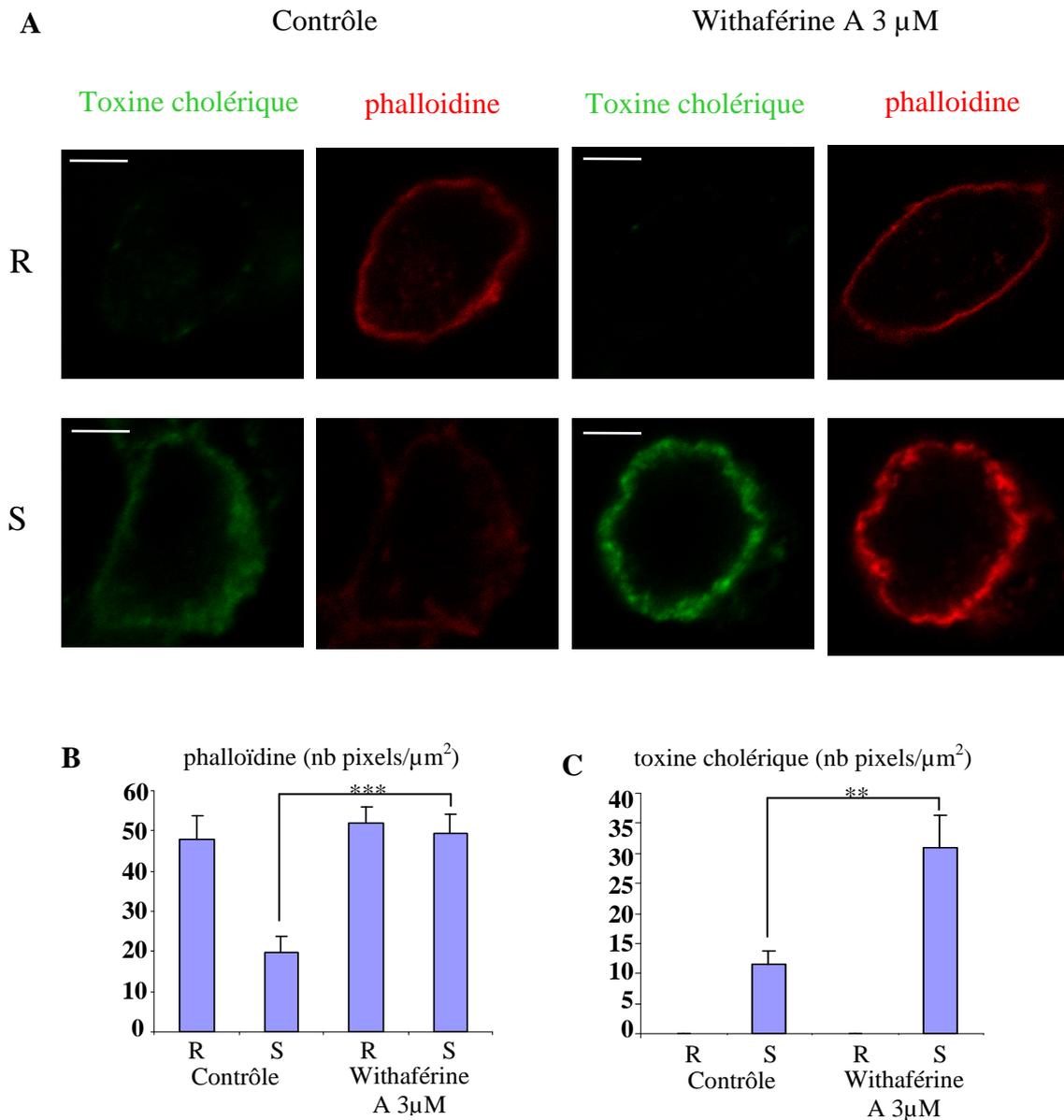
**Figure 30 : La distribution subcellulaire d'un mutant d'annexine A2 ne liant plus l'actine.**

Les cellules sont transfectées avec le plasmide contenant la séquence de l'annexineA2-GFP ou de l'annexineA2- $\Delta 9$ -GFP. Les cellules sont maintenues au repos ou stimulées 10 minutes avec une solution de KCl 59 mM, puis fixées, et incubées avec un anticorps anti-annexine A2, puis un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-555. Les images sont acquises au microscope confocal avec les mêmes paramètres d'acquisition. Barres : 5  $\mu$ m.



**Figure 31 : Effet de la withaférine A sur la sécrétion des catécholamines**

Les cellules sont incubées pendant 1 h à 37°C avec la noradrénaline tritiée. **A** Les cellules sont traitées avec des concentrations croissantes de withaférine A pendant 1 h à 37°C, puis maintenues au repos ou stimulées avec une solution de nicotine à 20 μM ou de KCl 59 mM, pendant 10 min à 37°C. **B** les cellules sont traitées avec 3 μM de withaférine A pendant 1 h à 37°C, puis stimulées avec une solution de nicotine à 20 μM à 37°C pendant le temps indiqué. Les résultats ont été obtenus au cours d'une expérience représentative. Des résultats similaires ont été observés au cours de trois essais indépendants.



**Figure 32 : La withaférine A augmente la quantité d'actine et la formation de microdomaines lipidiques dans les cellules chromaffines stimulées.**

**A** Les cellules sont traitées avec 3  $\mu$ M de withaférine A pendant 1 h à 37°C, puis maintenues au repos ou stimulées pendant 10 min à 37°C avec 20  $\mu$ M de nicotine en présence de toxine cholérique couplée à l'Alexa 488. Après fixation, l'actine est marquée par la phalloïdine couplée à la rhodamine. Les images sont acquises au microscope confocal par double exposition de la même section optique. Barres : 5  $\mu$ m.

**B/C** Analyse semi-quantitative du nombre de pixels correspondant à la phalloïdine (**B**) ou à la toxine cholérique (**C**). Les données sont exprimées en valeurs moyennes  $\pm$  SEM (n=25 cellules) et proviennent d'une expérience représentative. \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01 (test t de student). Des résultats similaires ont été obtenus lors de trois expériences indépendantes.

une concentration dépolarisante de  $K^+$ , mais en revanche la sécrétion basale n'est pas modifiée (5%). La concentration de withaférine A utilisée au cours des expériences suivantes est de 3  $\mu M$  et correspond à la dose induisant un effet maximal sur la sécrétion.

Pour compléter cette étude, nous avons testé l'effet de la withaférine A sur la cinétique de l'exocytose (Figure 31B). Dans les cellules contrôles comme dans les cellules traitées, le maximum de sécrétion est observé au bout de 4 minutes de stimulation par la nicotine. La withaférine A augmente donc la quantité de catécholamines libérées sans modifier la cinétique de sécrétion.

Nous avons ensuite étudié l'effet de la withaférine A sur l'organisation de l'actine et la liaison de la toxine cholérique dans les cellules chromaffines (Figure 32). Dans les cellules au repos, le traitement à la withaférine A ne modifie ni la structure de l'actine sous-corticale, ni la faible liaison de la toxine cholérique à la membrane plasmique. La stimulation par la nicotine induit bien la dépolymérisation de l'actine dans les cellules contrôles et traitées, mais ces dernières présentent un marquage de l'actine plus important formant un anneau discontinu. En parallèle, il y a aussi une augmentation de la liaison de la toxine cholérique à la surface des cellules. Ceci est confirmé par l'étude semi-quantitative des différents marquages : en effet, dans les cellules stimulées traitées à la withaférine A, la quantité d'actine est significativement supérieure à celle des cellules stimulées contrôles. De plus, la liaison de la toxine cholérique est également augmentée par le traitement des cellules stimulées.

Ces expériences suggèrent donc que la fasciculation de l'actine par l'annexine A2 dans les cellules stimulées pourrait participer à la coalescence de nanodomains en microdomaines lipidiques nécessaires à l'exocytose.

### **III) Conclusion**

Au cours de cette étude, j'ai ainsi cherché à comprendre comment l'annexine A2 forme des microdomaines lipidiques. Une piste intéressante était celle de l'intervention de l'actine. En effet, plusieurs études ont montré que l'annexine A2 est capable de former des complexes entre la membrane plasmique et l'actine (Merrifield et al., 2001; Rescher et al., 2004; Zobiack et al., 2002). Il était donc tout à fait envisageable que l'annexine A2 puisse utiliser des filaments d'actine pour organiser les membranes.

Les images de microscopie électronique à transmission montrent des structures filamenteuses constituées au moins en partie par des filaments d'actine. Par endroits, ces filaments forment un maillage apposé à la membrane plasmique. Dans les cellules stimulées, des filaments d'actine forment des structures denses autour des granules. Ces structures pourraient être des filaments qui n'ont pas été dépolymérisés lors de la stimulation, ou alors de filaments néosynthétisés. En effet, au laboratoire, les travaux de S. Gasman ont montré que la stimulation des cellules provoque la néosynthèse de filaments d'actine autour des granules grâce à la cascade Cdc42/N-WASP/Arp2/3 (Gasman et al., 2004). Ces structures d'actine pourraient participer à l'arrimage des granules et/ou exercer une pression sur ces granules pour favoriser l'expulsion de leur contenu. Ces filaments pourraient aussi intervenir dans le couplage entre les mécanismes d'exocytose et d'endocytose (Gasman et al., 2004; Malacombe et al., 2006).

Nous avons ensuite recherché si ces filaments d'actine pouvaient jouer un rôle dans la formation ou la stabilisation des microdomaines lipidiques formés au niveau des sites d'exocytose. Dans un premier temps, la présence d'actine au niveau des DRM a été mise en évidence. J'ai également observé que, dans les cellules stimulées, le réseau cortical d'actine est dépolymérisé, mais il subsiste de l'actine sous la membrane plasmique, qui colocalise avec les microdomaines lipidiques enrichis en GM1. De plus, en microscopie électronique, nous avons constaté que les radeaux lipidiques sont souvent associés à des filaments d'actine. Une telle association a déjà été décrite dans différents modèles : par exemple la déstructuration des radeaux lipidiques dans des cellules BHK induit un relargage d'actine (Harder et al., 1997). Dans des cellules Hela infectées par des bactéries *E. coli* entéropathogènes non invasives, des structures d'actine sont associées à des microdomaines lipidiques enrichis en PIP2 aux sites de contact bactérien (Rescher et al., 2004; Zobiack et al., 2002). Le même type de complexes rassemblant actine et microdomaines lipidiques est fréquemment retrouvé dans des cellules épithéliales (Oliferenko et al., 1999), dans des lymphocytes basophiles (Merrifield et al., 2001), des lymphocytes T (Lillemeier et al., 2006) ou des cellules musculaires (Babiychuk et al., 1999).

Pour déterminer l'importance fonctionnelle de la présence d'actine dans les microdomaines formés au cours de l'exocytose, nous avons utilisé la latrunculine B. Cette drogue séquestre des monomères d'actine, empêchant leur incorporation à l'extrémité barbée des filaments d'actine où se fait préférentiellement leur polymérisation. De ce fait, la

dynamique des filaments d'actine est déplacée en faveur d'une dépolymérisation à l'extrémité pointue (Spector et al., 1999). La perturbation de l'actine par la latrunculine B entraîne une augmentation de la coalescence des microdomaines lipidiques dans les cellules au repos. Dans les cellules stimulées, le traitement à latrunculine B inhibe la formation des microdomaines lipidiques. Ces deux effets ont été observés en microscopie optique et électronique, et confirmés par des analyses statistiques. Ceci suppose un rôle double de l'actine dans l'organisation des membranes : d'une part elle permettrait de stabiliser la structure de la membrane plasmique dans les cellules au repos, et d'autre part, elle jouerait un rôle plus dynamique dans la coalescence des microdomaines lipidiques lors de la stimulation.

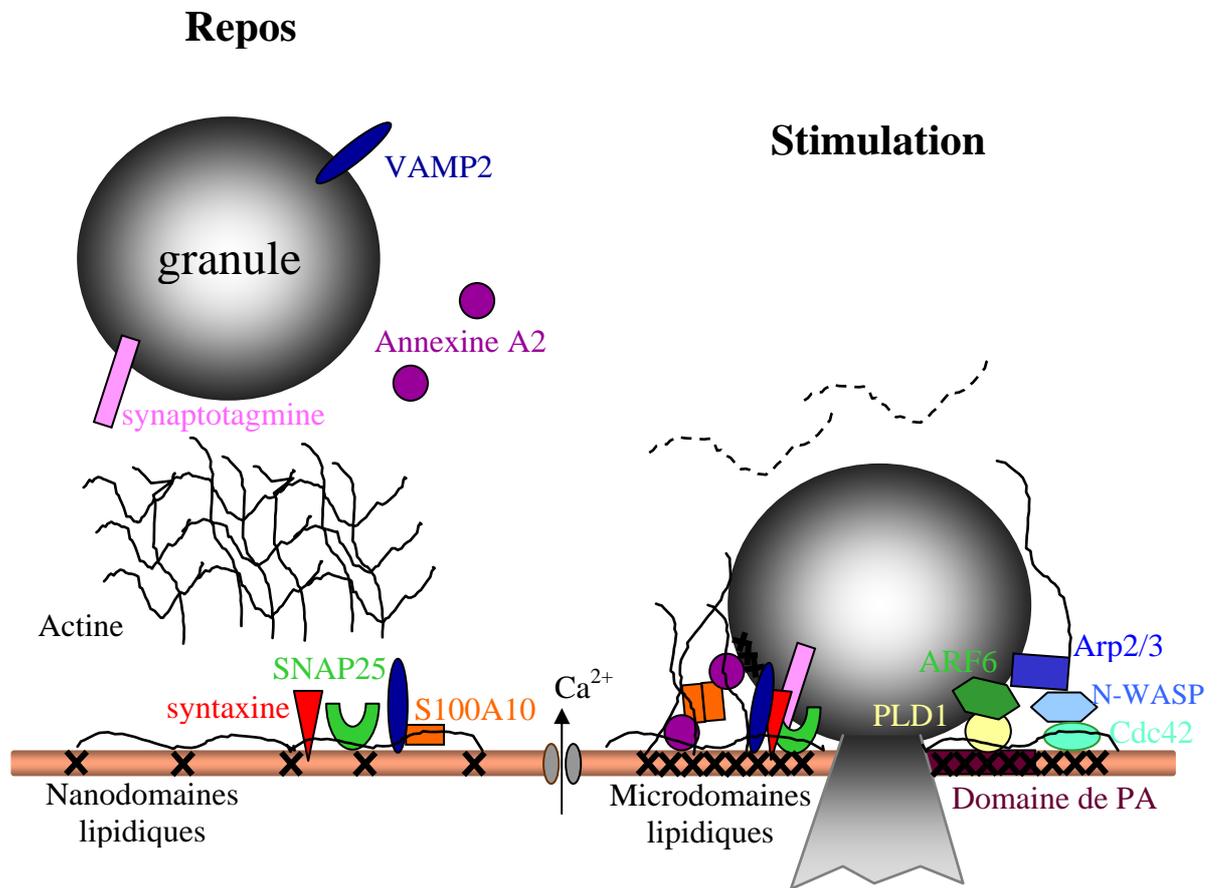
Enfin, nous avons mis en évidence que l'actine pourrait être un partenaire de l'annexine A2 pour former les microdomaines lipidiques. Le fait que l'annexine A2 n'intervienne pas dans la dépolymérisation du cortex d'actine (Chasserot-Golaz et al., 2005) n'exclut pas que l'annexine A2 puisse effectuer des modifications plus fines du cytosquelette d'actine au niveau de la membrane plasmique. Les résultats obtenus dans les cellules traitées à la latrunculine B permettent d'impliquer l'actine dans la formation des microdomaines lipidiques, mais pas de savoir si ces modifications du cytosquelette sont induites par l'annexine A2. Pour établir une corrélation entre l'annexine A2, l'actine (Filipenko and Waisman, 2001; Jones et al., 1992) et les microdomaines lipidiques, nous avons utilisé la withaférine A, qui stimule la capacité de l'annexine A2 tétramérique à fasciculer des filaments d'actine (Falsey et al., 2006). Cette drogue augmente la sécrétion des catécholamines et la formation de microdomaines lipidiques spécifiquement dans les cellules stimulées. Ceci suggère que la réticulation de filaments d'actine par l'annexine A2 est corrélée à la formation de microdomaines lipidiques et à l'exocytose. Nos observations sont en accord avec des études menées dans d'autres modèles. En effet, dans les cellules musculaires lisses, l'annexine A2 participe à la mise en place de complexes entre des microdomaines lipidiques et le cytosquelette d'actine, pour augmenter les forces exercées sur la membrane lors de la contraction musculaire (Babiyshuk et al., 1999). Dans les cellules épithéliales, l'annexine A2 a aussi été impliquée dans la réorganisation de l'actine au niveau de microdomaines lipidiques et cela participe à la stabilisation des radeaux (Oliferenko et al., 1999).

L'ensemble de nos résultats suggèrent que, dans les cellules chromaffines, **l'annexine A2 pourrait former des microdomaines lipidiques en réticulant des microfilaments d'actine**

**ancrés à la membrane plasmique**, ce qui entraînerait la coalescence des microdomaines et/ou limiterait leur diffusion latérale. Les microdomaines lipidiques ainsi regroupés pourraient alors jouer pleinement leur rôle dans la maturation des sites d'exocytose.

Une question encore en suspens est : quelle est l'origine des filaments d'actine réticulés par l'annexine A2 ? Les expériences que nous avons menées jusqu'ici avec la withaférine A ne permettent pas de définir si l'annexine A2 intervient sur les mailles du cytosquelette sous-membranaire ou sur les filaments d'actine entourant les granules. Pour répondre à cette question, nous envisageons des expériences en microscopie électronique à transmission sur des feuillettes de membrane plasmique de cellules traitées à la withaférine A. Ceci devrait nous permettre de savoir quelles sont les structures d'actine affectées par l'annexine A2.





**Figure 33 : Le modèle hypothétique du rôle de l'annexine A2 et des microdomaines lipidiques au cours de l'exocytose.**

## Discussion générale et perspectives

L'ensemble de mon travail de thèse a permis de démontrer l'importance et le rôle de l'annexine A2 dans le processus d'exocytose régulée par le calcium. A partir de ces résultats, le modèle suivant peut être proposé (figure 33) : dans les cellules au repos, l'annexine A2 serait cytosolique et S100A10 interagirait avec VAMP2 à la membrane plasmique. Les granules de sécrétion seraient séparés de la membrane plasmique par un réseau cortical d'actine et certaines protéines de la machinerie d'exocytose dont les protéines SNARE (syntaxine, SNAP25, et VAMP2) seraient déjà organisées en agrégats dans la membrane plasmique, définissant ainsi des présites de sécrétion. Un maillage d'actine apposé sous la membrane plasmique participerait à l'organisation de cette membrane au repos, en maintenant les nanodomains lipidiques éloignés les uns des autres. Lors de la stimulation, l'annexine A2 transloquerait vers la membrane plasmique et serait recrutée par S100A10 près de la machinerie sécrétrice, où le tétramère se formerait. Parallèlement, la barrière sous-corticale d'actine serait déstructurée, les granules pourraient donc accéder à la membrane plasmique. L'annexine A2, en fasciculant des filaments d'actine préexistants ou néoformés, permettrait la coalescence de nanodomains en microdomains lipidiques au niveau des présites d'exocytose. Ceci favoriserait d'une part le recrutement et/ou l'arrimage des granules à ces sites, et d'autre part permettrait l'assemblage, voire l'activation des différents acteurs du processus, de manière à rendre les sites d'exocytose pleinement fonctionnels. La cascade Cdc42/N-WASP/Arp2/3, responsable de la néopolymérisation de filaments d'actine, et certains acteurs de la fusion (ARF6/PLD1/PA) pourraient être recrutés et/ou activés dans ces microdomains lipidiques.

Trois points de ce modèle sont intimement liés à la régulation spatiotemporelle du processus d'exocytose. Le premier concerne le recrutement de l'annexine A2 au niveau des présites de sécrétion, qui implique une organisation de la machinerie d'exocytose déjà dans les cellules au repos. J'aborderai ensuite le rôle du cytosquelette d'actine dans l'assemblage des radeaux lipidiques par l'annexine A2. Pour terminer, j'ouvrirai la discussion sur les différents rôles que les microdomains lipidiques pourraient jouer au cours de l'exocytose, notamment dans l'assemblage et/ou l'activation de la machinerie de sécrétion.

## I) L'annexine A2 est recrutée au niveau de présites d'exocytose.

La compréhension de la régulation spatiotemporelle du processus de sécrétion est une préoccupation majeure et mes résultats suggèrent que l'annexine A2 jouerait un rôle important dans ce contrôle en formant des microdomaines lipidiques qui organiseraient la machinerie sécrétrice. Nous avons mis en évidence que le recrutement de cette protéine ne se faisait pas au hasard mais au niveau d'agrégats de protéines SNARE : en effet, dans les cellules chromaffines, l'annexine A2 serait recrutée à la membrane plasmique grâce à l'interaction de S100A10 avec VAMP2. Nos images de microscopie électronique à transmission sur des feuillettes de membrane plasmique montrent que S100A10 est présente dans des agrégats de VAMP2 et/ou de syntaxine dans les cellules au repos. Nous proposons donc que grâce à l'interaction de S100A10 avec VAMP2, la translocation de l'annexine A2 soit ciblée vers les protéines SNARE, c'est à dire au bon endroit pour pouvoir activer la machinerie sécrétrice et permettre l'arrimage des granules. En accord avec cette hypothèse, Lopez et coll. (Lopez et al., 2007) ont récemment proposé que, dans des cellules chromaffines en culture, des domaines de syntaxine 1 et de SNAP25 préexistants dans la membrane plasmique définiraient les sites de fusion des granules. *In situ*, ces présites d'exocytose regrouperaient également des canaux calciques, ce qui permettrait de coupler la stimulation avec le processus sécréteur. Dans d'autres modèles comme les cellules PC12, les cellules pancréatiques et les cellules endothéliales, des agrégats de syntaxine semblent aussi constituer des plate-formes préférentielles pour l'arrimage des granules destinés à la sécrétion (Lang et al., 2001; Ohara-Imaizumi et al., 2004; Predescu et al., 2005).

Grâce à des analyses statistiques par la fonction K de Ripley des immunomarquages réalisés sur les feuillettes de membrane plasmique, la taille des agrégats de S100A10 et de VAMP2 ou de syntaxine a pu être évaluée à environ 120 nm. Par ailleurs, des études en microscopie électronique ont permis de définir une taille d'environ 100 à 200 nm pour les amas de syntaxine 1 dans les cellules PC12 (Lang et al., 2001), et d'environ 100 à 150 nm pour les domaines de syntaxine 4 et de SNAP23 dans des cellules endothéliales (Predescu et al., 2005), ce qui est comparable à la dimension de domaines de protéines SNARE que nous avons décrits. Dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques, les tailles des groupes de syntaxine 1 et de SNAP25 ont été estimées à environ 250 nm et 275 nm respectivement, par mesure de l'étendue des spots en TIRFM (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) (Ohara-

Imaizumi et al., 2004). Une étude par microscopie de fluorescence montre que, sur des feuillettes de membrane plasmique de cellules PC12, les molécules de syntaxine 1 sont regroupées dans un espace de 190 nm de diamètre (Lang et al., 2001). On peut cependant noter que les dimensions mesurées par ces auteurs (Lang et al., 2001; Ohara-Imaizumi et al., 2004) ont probablement été surévaluées à cause des limites techniques de la microscopie de fluorescence (Lang, 2007). En effet, des analyses par STED (stimulation emission depletion microscopy), ont montré que les agrégats de syntaxine 1 seraient de taille inférieure (environ 70 nm) (Sieber et al., 2006). L'ensemble de ces résultats suggère l'existence, dans les membranes plasmiques, d'agrégats de protéines SNARE de 100 à 200 nm de diamètre, qui pourraient constituer des présites d'exocytose. Ainsi, il y aurait déjà une certaine organisation de la machinerie sécrétrice dans les membranes de cellules chromaffines au repos. Lors de la stimulation, l'annexine A2 semble recrutée au niveau de ces présites grâce à l'interaction de S100A10 avec VAMP2 et donc, pour la première fois, un rapport direct entre l'annexine A2 et les protéines du complexe SNARE a pu être établi. L'existence d'un tel lien conforte l'idée que l'annexine A2 pourrait être un interrupteur calcique de la sécrétion (Gerke et al., 2005; Monastyrskaya et al., 2006) : en effet, sa translocation est dépendante du calcium et permet la formation de microdomaines lipidiques nécessaires à l'activation de la machinerie d'exocytose, en particulier des protéines SNARE (Knecht and Grubmuller, 2003; Salaun et al., 2004a).

## **II) L'actine participe à la formation des microdomaines lipidiques par l'annexine A2.**

En raison de ses propriétés structurales, l'annexine A2 est capable de former les microdomaines lipidiques de plusieurs manières, en particulier en agissant directement sur les lipides (Gokhale et al., 2005; Menke et al., 2005). En effet, l'oligomérisation d'annexine A2 tétramérique à la surface de bicouches lipidiques entraîne la séquestration de molécules de phosphatidyl-sérine (PS) (Menke et al., 2005; Menke et al., 2004). De plus, l'annexine A2 participe aussi à la formation d'agrégats de PIP2 en présence de calcium et de cholestérol (Gokhale et al., 2005; Hayes et al., 2004a; Rescher et al., 2004). Il est donc envisageable que l'annexine A2 puisse former des microdomaines lipidiques en regroupant latéralement PS et/ou PIP2. Deuxièmement, l'annexine A2 pourrait former des complexes entre les membranes et le cytosquelette d'actine (Falsey et al., 2006). C'est ce dernier rôle qui a particulièrement retenu notre attention. Dans ce paragraphe, nous verrons dans un premier temps comment l'annexine A2 pourrait utiliser l'actine pour former les microdomaines lipidiques. Etant donné que les effets de l'annexine A2 sur l'actine et les lipides peuvent coexister, je décrirai ensuite des expériences qui permettraient de déterminer la séquence d'évènements menant à l'organisation des microdomaines lipidiques par l'annexine A2. Finalement, l'implication d'autres éléments du cytosquelette dans ce processus sera envisagée.

### **1) L'annexine A2 réorganise le cytosquelette d'actine au niveau des sites d'exocytose.**

L'observation de la face interne de la membrane plasmique de cellules chromaffines au repos en microscopie électronique a permis de mettre en évidence une association préférentielle de nanodomaines lipidiques avec des filaments d'actine. Ces structures forment des mailles apposées à la membrane. Considérant que les lipides peuvent, en raison de leurs propriétés biophysiques, s'agréger spontanément de manière transitoire (Simons and Vaz, 2004), ces structures d'actine empêcheraient les microdomaines lipidiques de se regrouper de manière aspécifique et permettraient la séparation physique des nanodomaines lipidiques (Jacobson et al., 2007). Nos observations confortent la théorie proposée il y a une dizaine d'années selon laquelle le cytosquelette est un des éléments permettant l'organisation des

membranes (Jacobson et al., 1995; Kusumi et al., 1993). Ceci expliquerait pourquoi la dépolymérisation du cytosquelette d'actine par la latrunculine dans les cellules au repos provoque une association anormale de microdomaines lipidiques.

Il paraît alors assez logique que lors de la stimulation la réorganisation du cytosquelette d'actine modifie l'organisation de la membrane plasmique. Les expériences menées dans les cellules chromaffines stimulées traitées à la latrunculine B ont montré l'absence de coalescence des microdomaines lipidiques et nous pouvons donc en déduire que des filaments d'actine sont nécessaires à la formation de microdomaines au niveau des sites d'exocytose. Il est envisageable que la dépolymérisation des filaments maintenant les nanodomaines séparés soit suivie d'une néosynthèse de filaments permettant la formation et/ou la stabilisation des microdomaines lipidiques. En accord avec cette hypothèse, les travaux menés au laboratoire par Stéphane Gasman décrivent la néoformation de filaments d'actine grâce à la cascade Cdc42/N-WASP/Arp2/3 au niveau des granules (Gasman et al., 2004), mais nous ne pouvons cependant pas exclure que les structures, à la base du regroupement des nanodomaines en microdomaines lipidiques lors de la stimulation, soient des filaments résiduels non dépolymérisés lors de la stimulation.

Nos observations de l'effet de la withaférine A sur la formation des microdomaines lipidiques dans les cellules stimulées indiquent que l'annexine 2 pourrait utiliser ces structures d'actine pour promouvoir la coalescence de radeaux. Pour l'instant, il n'est pas possible de définir précisément si les cibles de la fasciculation sont des filaments d'actine néosynthétisés ou préexistants. Toutefois, l'annexine A2 interagissant avec un certain nombre de protéines impliquées dans la polymérisation de l'actine, en particulier les Rho GTPases Cdc42 (Martin-Belmonte et al., 2007) et Rac1 (Hansen et al., 2002), qui ont été associées à des microdomaines lipidiques (del Pozo et al., 2004; Guan, 2004; Prag et al., 2007), l'annexine A2 pourrait réguler spatialement la néopolymérisation de filaments d'actine. Dans ce cadre, une intervention du PIP2, lipide membranaire que l'annexine A2 peut regrouper en amas, pourrait tout à fait être envisagée. En effet, le PIP2 est impliqué dans le processus de sécrétion régulée, il est associé aux microdomaines lipidiques, et des domaines de PIP2 constituent fréquemment des points d'ancrage des filaments d'actine à la membrane plasmique, (Di Paolo and De Camilli, 2006; Gokhale et al., 2005; Hayes et al., 2004a; Parmryd et al., 2003; Rescher et al., 2004). De plus, dans les cellules épithéliales, la formation d'agrégats de PIP2 à la membrane plasmique par l'annexine A2 permet le recrutement de Cdc42 sous forme active, induisant donc une néosynthèse localisée de filaments d'actine (Martin-Belmonte et al., 2007). Par conséquent, l'annexine A2 pourrait, en interagissant avec le PIP2, recruter la

cascade Cdc42/N-WASP/Arp2/3 au niveau des nanodomains lipidiques, permettre la néoformation de filaments d'actine, pour ensuite les réticuler afin de former des radeaux lipidiques. Pour tester cette hypothèse, nous avons généré des mutants de l'annexine A2 couplés à la GFP et incapables de lier le PIP2. Des expériences préliminaires ont montré que les mutants AnxA2-K279A-GFP et AnxA2-K281A-GFP (Gokhale et al., 2005) sont recrutés à la membrane plasmique lors de la stimulation, et ils pourront donc être utilisés pour étudier l'implication de la liaison au PIP2 dans la réorganisation du cytosquelette d'actine par l'annexine A2 lors de la formation de microdomaines lipidiques nécessaires à l'exocytose.

## **2) La formation de microdomaines par l'annexine A2 requiert-elle l'intervention séquentielle ou synergique de l'actine et des lipides ?**

Il existe probablement un haut niveau de coopérativité entre les effets de l'annexine A2 médiés par le cytosquelette ou par les lipides. En effet, il est vraisemblable que l'annexine A2 agisse de manière conjointe sur le recrutement latéral des phospholipides, sur la liaison des ces lipides au cytosquelette, et sur la formation de faisceaux d'actine filamenteuse, pour former et stabiliser les microdomaines lipidiques dans la membrane plasmique. La séquence d'évènements menant à la formation de radeaux serait particulièrement intéressante à étudier. Un premier élément de réponse pourrait être apporté par l'étude de l'effet de la filipine, drogue affectant la structure des microdomaines lipidiques, sur l'organisation des filaments d'actine présents au point d'ancrage des granules.

L'étude de la dynamique d'association des microdomaines lipidiques serait aussi importante pour déterminer la chronologie des différentes étapes de leur formation. Pour cela, plusieurs techniques sont envisageables : la technique de suivi d'une particule unique (single particle tracking) permet d'accéder à la dynamique de diffusion d'une molécule isolée, marquée par une bille de latex ou d'or colloïdal observable en microscopie photonique, et de déterminer son confinement dans la membrane plasmique d'une cellule vivante (Kusumi et al., 2005). Une autre approche intéressante est la spectroscopie par corrélation de fluorescence couplée à la microscopie confocale, qui mesure des fluctuations d'intensité de fluorescence liées à la diffusion des fluorophores dans une zone définie. Ceci permettrait d'évaluer dans des cellules vivantes la cinétique de regroupement de microdomaines lipidiques (Wawrezynieck et al., 2005). Une troisième possibilité est le FRET (Fluorescence resonance energy transfer), qui permet d'évaluer la distance séparant deux molécules étiquetées avec deux fluorophores différents, choisis de telle sorte que la longueur d'onde d'émission du

donneur corresponde à la longueur d'onde d'excitation de l'accepteur. Après excitation, l'émission de fluorescence par le donneur va ainsi exciter l'accepteur si celui-ci se trouve à faible distance. Grâce à cette technique, il est possible d'évaluer de manière dynamique des interactions moléculaires, et donc de déterminer la capacité de molécules des microdomaines lipidiques à s'associer entre elles (Silvius, 2003). Ces trois techniques pourraient permettre de suivre, dans les cellules chromaffines, la dynamique de diffusion et d'association de composants des microdomaines lipidiques. Nous pourrions donc définir dans quelle mesure et à quelle échelle de temps l'annexine A2 modifie le cytosquelette d'actine et/ou des lipides pour former des radeaux au sein des membranes.

### **3) Quel rôle pour les autres éléments du cytosquelette ?**

Dans la mesure où les microtubules interviennent dans le transport de granules vers la périphérie cellulaire, une interaction entre les microtubules et les microdomaines lipidiques constituant des sites d'exocytose fonctionnels pourrait diriger les nouveaux granules en direction de sites où le processus sécréteur est actif. Un rôle des microtubules dans la stabilisation de microdomaines lipidiques a été mis en évidence dans des cellules musculaires cardiaques (Head et al., 2006) et dans les cellules en migration. En effet, les microtubules peuvent être associés par l'intermédiaire de la protéine IQGAP1 à des microdomaines lipidiques enrichis en PIP2 et ils seraient recrutés pour amplifier la coalescence et la stabilisation des microdomaines par l'actine dans les cellules en migration (Golub and Caroni, 2005). Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de drogues affectant les microtubules sur la formation des microdomaines lipidiques au cours de l'exocytose.

Un autre élément du cytosquelette susceptible de participer à la formation de microdomaines lipidiques par l'annexine A2 est la spectrine non-érythroïde, encore appelée fodrine. Cette protéine, impliquée dans le processus d'exocytose (Perrin and Aunis, 1985; Perrin et al., 1987) et présente dans les microdomaines lipidiques (Grzybek et al., 2006), peut assurer un lien entre l'actine et la membrane plasmique. Ainsi, la fodrine, en interagissant avec l'annexine A2 (Cheney and Willard, 1989), pourrait agir en conjonction avec l'actine pour organiser et stabiliser des microdomaines lipidiques. L'annexine A2 pourrait donc être une protéine clef dans l'organisation spatiotemporelle et surtout dans la coordination des différents éléments du cytosquelette avec les événements membranaires. Ce rôle de chef d'orchestre serait essentiel au bon fonctionnement global de la machinerie d'exocytose.

### **III) Le rôle des microdomaines lipidiques formés par l'annexine A2 dans l'exocytose.**

Lors de la sécrétion, les différents acteurs de l'exocytose doivent être assemblés en une machinerie complexe au niveau des sites d'exocytose pour que la sécrétion puisse avoir lieu. De plus, ces différents partenaires moléculaires doivent être recrutés et/ou activés au bon moment après la stimulation de la sécrétion. La formation de microdomaines lipidiques dans les cellules stimulées pourrait permettre la régulation de ces deux paramètres.

Au vu de nos résultats, l'intervention des radeaux lipidiques formés par l'annexine A2 dans le couplage entre la stimulation et le processus exocytotique n'est pas envisageable, car l'annexine A2 ne transloque à la membrane plasmique qu'après stimulation de la sécrétion, et la formation des microdomaines lipidiques est donc postérieure à la réception du signal déclenchant l'exocytose. De plus, nous avons constaté que la filipine inhibe la sécrétion des catécholamines dans les cellules chromaffines stimulées par la nicotine, mais également par l'introduction d'ions calciques libres dans le cytoplasme de cellules perméabilisées (Publication 1). Ceci indique que les microdomaines lipidiques interviennent en aval de l'organisation des récepteurs nicotiques et des canaux calciques dans la membrane plasmique. Au cours des paragraphes suivants, les rôles des microdomaines lipidiques dans l'assemblage, dans l'activation de la machinerie sécrétrice, et finalement dans la fusion membranaire seront envisagés.

#### **1) Les microdomaines lipidiques participeraient à l'assemblage de la machinerie sécrétrice.**

Nos résultats suggèrent que les microdomaines lipidiques sont indispensables à l'exocytose dans les cellules chromaffines. En vertu de leur rôle très documenté dans le regroupement de molécules associées à une fonction particulière (voir chapitre 3), les microdomaines lipidiques pourraient intervenir dans le regroupement latéral des protéines de la machinerie sécrétrice. Cette hypothèse est étayée par de nombreuses observations dans divers modèles cellulaires, montrant notamment la présence des protéines de l'exocytose dont les protéines du complexe SNARE dans des microdomaines lipidiques, telles que la syntaxine 3 et la Ti-VAMP dans les cellules MDCK (Madin-Darby canine kidney) (Lafont et al., 1999),

ou la syntaxine 1, la SNAP-25 et la VAMP2 dans les cellules PC12 et les neurones (Chamberlain et al., 2001; Gil et al., 2005). Différentes isoformes de SNARE sont également présentes dans les DRM de cellules alvéolaires de type II (Chintagari et al., 2006). Dans les mastocytes, la SNAP-23, la VAMP2 et la syntaxine 4 forment des complexes SNARE dans les microdomaines lipidiques lors de la stimulation de l'exocytose (Puri and Roche, 2006). De plus, la destruction des microdomaines lipidiques par déplétion du cholestérol dans les cellules PC12 inhibe la sécrétion (Chamberlain et al., 2001; Lang et al., 2001), démontrant que l'intégrité de ces radeaux est importante pour l'exocytose (Salaun et al., 2004a).

Les microdomaines lipidiques pourraient aussi regrouper des lipides impliqués dans l'exocytose. Ainsi le PS, composant des microdomaines lipidiques formés par l'annexine A2, jouerait un rôle dans l'arrimage de granules à la membrane plasmique (Uchiyama et al., 2007) et interviendrait comme effecteur de la synaptotagmine pour permettre la fusion du granule avec la membrane plasmique (Bhalla et al., 2005). Il en est de même pour le PIP<sub>2</sub>, qui, au cours de l'exocytose, permet la génération de seconds messagers comme le diacylglycérol ou l'IP<sub>3</sub> (Di Paolo and De Camilli, 2006) et intervient dans la formation de complexes entre la membrane et le cytosquelette d'actine (Di Paolo and De Camilli, 2006; Yin and Janmey, 2003).

Par ailleurs, dans les cellules chromaffines, nous avons montré que l'actine est présente dans des microdomaines lipidiques et participe à leur coalescence. Il est donc possible que ces radeaux permettent en retour la régulation spatiale de l'assemblage et/ou de la néosynthèse de filaments d'actine par la cascade Cdc42/N-WASP/Arp2/3 (Gasman et al., 2004), de manière à permettre l'arrimage des granules ou l'expulsion du contenu granulaire grâce à des forces de compression (Malacombe et al., 2006).

Les microdomaines lipidiques formés par l'annexine A2 dans les cellules chromaffines sous l'effet de la stimulation pourrait donc constituer des plate-formes regroupant les différents acteurs de l'exocytose, aussi bien protéiques que lipidiques, pour leur permettre d'agir de façon conjointe au bon endroit et au bon moment. De plus, nous ne pouvons pas exclure un rôle supplémentaire des microdomaines lipidiques dans le couplage de l'exocytose et de l'endocytose : ils permettraient de maintenir ensemble les éléments de la machinerie présents sur les granules pour permettre un recyclage ciblé et rapide (Sokac and Bement, 2006; Wienisch and Klingauf, 2006).

## **2) Les microdomaines lipidiques seraient capables d'activer la machinerie de sécrétion.**

En complément de leur rôle purement structural, les microdomaines lipidiques pourraient également être impliqués dans l'activation des constituants de la machinerie d'exocytose, soit directement, soit en recrutant ou en excluant des protéines qui les régulent. Un premier mode d'action des microdomaines lipidiques serait de moduler la conformation de certains protagonistes. Ceci a été montré pour la syntaxine (Knecht and Grubmuller, 2003) et il est possible que ce type de régulation affecte d'autres acteurs de l'exocytose (Salaun et al., 2004a).

Les microdomaines lipidiques pourraient aussi permettre l'association de protéines de l'exocytose avec leurs substrats et/ou leurs effecteurs. En effet, dans les cellules chromaffines, il se produit une activation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) lors de l'exocytose (Chasserot-Golaz et al., 1998). Une étude suggère que le cholestérol et les microdomaines lipidiques pourraient jouer un rôle positif dans l'activation de la PI3K en augmentant localement les concentrations de cette enzyme et de son principal substrat, le PIP2 (Peres et al., 2003). Il est donc possible que la formation de microdomaines lipidiques au niveau des sites d'exocytose entraîne l'activation de la PI3K, qui pourrait alors moduler la quantité de PIP2 et/ou de PIP3 présente et subséquentment leurs effets dans le processus de sécrétion.

Un autre exemple est celui de l'activation de la PLD1 au cours de l'exocytose dans les cellules chromaffines (Vitale et al., 2001). Cette enzyme est activée par la GTPase monomérique ARF6 présente sur la membrane des granules, elle-même sous le contrôle de son facteur d'échange ARNO qui, lui, est localisé à la membrane plasmique (Vitale et al., 2002). La formation de microdomaines lipidiques pourrait donc permettre le regroupement de la PLD1 et d'ARNO au niveau des sites d'arrimage des granules, entraînant l'activation de la cascade menant à la production localisée de PA par la PLD1 aux sites d'exocytose. Ceci est d'autant plus probable qu'une activation de la PLD1 dans des microdomaines lipidiques a pu être montrée dans différentes études (Du et al., 2003; Han et al., 2002; Kim et al., 2000; Mansfield et al., 2005).

Pour terminer, les microdomaines lipidiques pourraient également exclure des protéines ayant un effet régulateur négatif de l'exocytose. Ainsi, la protéine Munc 18, qui empêche la syntaxine de s'associer dans les complexes SNARE, est trouvée essentiellement en dehors des radeaux lipidiques, alors que la formation de complexes SNARE se fait préférentiellement

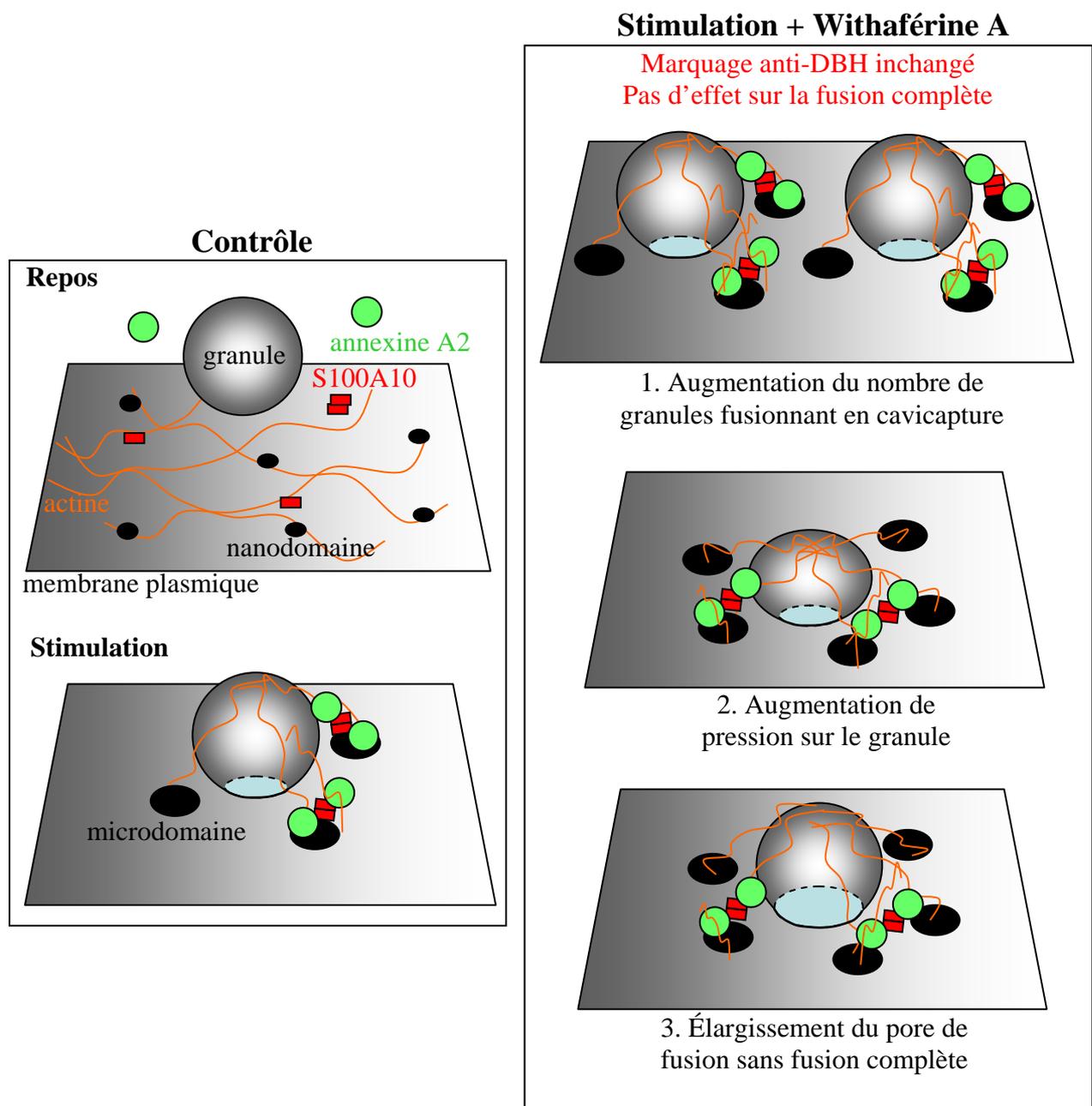
dans ces radeaux (Chamberlain et al., 2001; Pombo et al., 2003). Les protéines  $\alpha$ -SNAP et NSF, impliquées dans la dissociation des complexes SNARE, semblent également spécifiquement exclus des microdomaines lipidiques (Chamberlain et al., 2001).

Les microdomaines permettraient donc bien une forme de régulation spatiotemporelle de la machinerie exocytotique, en recrutant ou en excluant certaines protéines à un moment donné du processus et en autorisant leur activation.

### **3) L'intervention des microdomaines lipidiques dans la fusion.**

Les résultats que nous avons obtenus dans les cellules dépourvues d'annexine A2 fonctionnelle montrent que l'annexine A2 est plutôt impliquée dans l'arrimage et l'amorçage du granule (Publication 1). Cependant, l'accumulation et la ségrégation de certaines formes de lipides dans les microdomaines lipidiques pourrait agir sur la fusion en modulant la rigidité et/ou la courbure de la membrane plasmique (Salaun et al., 2004a; Zimmerberg and Chernomordik, 1999). Par exemple, le PIP2, normalement en forme de cône inversé, subirait un changement de conformation en cône droit en présence de calcium, et de ce fait pourrait promouvoir en partie la courbure des membranes (Salaun et al., 2004a). Un autre lipide important au cours de l'exocytose est l'acide phosphatidique (PA) formé par la PLD1. Le PA peut également favoriser la courbure membranaire grâce à sa structure en cône (Zeniou-Meyer et al., 2007). Le regroupement de PIP2 et de PA dans les microdomaines lipidiques pourrait donc constituer un moyen de réguler la capacité des membranes à se courber et donc faciliter la fusion de la membrane granulaire avec la membrane plasmique.

L'utilisation de la withaférine A nous a permis de soulever un autre rôle possible des microdomaines lipidiques dans la fusion. En effet, nous avons pu observer que le traitement des cellules avec cette drogue augmentait significativement la formation de microdomaines ainsi que la sécrétion des catécholamines. En revanche, une expérience préliminaire (non présentée dans ce manuscrit) suggère que le nombre de sites d'exocytose révélés par un anticorps dirigé contre la DBH ne semble pas être affecté par cette drogue. Pour une raison d'encombrement stérique, les anticorps anti-DBH permettraient de visualiser les sites où la fusion entre la membrane granulaire et la membrane plasmique est complète, mais pas ceux où il y a une fusion de type cavapture caractérisée par une ouverture transitoire du pore de fusion. Les microdomaines lipidiques pourraient donc favoriser la cavapture au détriment de la fusion complète (figure 34), en consolidant la membrane au niveau des sites d'exocytose afin de limiter l'expansion du pore de fusion (Simons and Ikonen, 1997). Ceci



**Figure 34 : Les hypothèses concernant l'effet de la withaférine A sur la régulation de la fusion par les microdomaines lipidiques.**

Dans les cellules contrôles, la stimulation provoque la translocation de l'annexine A2 à la membrane plasmique et la formation du tétramère, qui fasciculerait des filaments d'actine pour induire la coalescence de nanodomaines en microdomaines lipidiques. Dans les cellules stimulées, la withaférine A augmente la fasciculation de l'actine par l'annexine A2, ce qui accroît la formation des microdomaines lipidiques et la sécrétion des catécholamines. Le traitement à la withaférine A n'augmente pas le marquage de la DBH, ce qui impliquerait les microdomaines lipidiques dans la régulation de la cavapture. Les microdomaines formés dans ces conditions pourraient : **1.** augmenter le nombre de granules arrimés effectuant une cavapture ; **2.** augmenter grâce aux filaments d'actine les forces de compression appliquées sur un granule pour amplifier la sécrétion des petites molécules qu'il contient ; **3.** réguler l'élargissement du pore de fusion sans que cela aboutisse à une fusion complète.

aurait l'intérêt physiologique de réguler à la fois la quantité et la nature des produits de sécrétion libérés, puisque seules les petites molécules peuvent être sécrétées par cavocapture (Fulop et al., 2005). Pour étudier plus en détail l'intervention des microdomaines lipidiques dans la régulation de l'expansion du pore de fusion, nous envisageons deux types d'expériences. La première consistera à enregistrer par ampérométrie la sécrétion des catécholamines par un granule unique en présence de withaférine A. Nous pourrions ainsi définir si l'augmentation de sécrétion des catécholamines entraînée par cette drogue est due à une modification d'évènements individuels ou à une augmentation du nombre de ces évènements. Une seconde expérience visera à déterminer la quantité de chromogranine A sécrétée dans le milieu extracellulaire sous l'effet de ce même traitement. La chromogranine A étant une grosse molécule, elle n'est pas sécrétée lors d'une fusion de type cavocapture. L'ensemble de ces nouveaux résultats devrait permettre de déterminer par quel(s) mécanisme(s) les microdomaines lipidiques formés grâce à l'effet de l'annexine A2 sur l'actine pourraient intervenir dans la régulation de la fusion membranaire.

#### **IV) Perspectives**

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse a permis de déterminer l'implication de l'annexine A2 dans l'assemblage des sites d'exocytose dans les cellules chromaffines. L'élucidation des mécanismes de formation des microdomaines lipidiques et de leur rôle précis complètera non seulement nos connaissances du processus de sécrétion neuroendocrine mais permettra plus généralement de comprendre les modes de formation et de régulation de ces radeaux dans les membranes biologiques. Ces mécanismes apparaissent de plus en plus souvent couplés au contrôle spatial et temporel de la transduction du signal, et la compréhension des évènements régulant ces microdomaines lipidiques représente un défi majeur pour le futur.

Le rôle de l'annexine 2 dans la formation des micro-domaines lipidiques a été étudié principalement dans des cellules non-neuronales, et impliqué notamment dans des évènements liés aux membranes. Mais récemment, Zhao et al. (Zhao et al., 2004) ont suggéré pour la première fois que l'association dynamique de l'annexine 2 aux microdomaines lipidiques formés au niveau des dendrites pourrait jouer un rôle lors de l'apprentissage et la consolidation de la mémoire chez le rat. De plus, les mécanismes moléculaires qui gouvernent

l'exocytose des neurotransmetteurs dans les neurones présentent de très fortes analogies avec la sécrétion par les cellules neuroendocrines (Gundelfinger *et al.*, 2003). Il est donc possible que l'annexine 2 soit aussi responsable de la formation des microdomaines lipidiques nécessaires au bon fonctionnement et/ou à la plasticité des synapses.

La formation des microdomaines lipidiques par l'annexine A2 pourrait également présenter une grande importance dans un contexte clinique. En effet, le rôle joué par la protéine S100A10 au cours de traitements antidépresseurs (Svenningsson *et al.*, 2006) laisse supposer une implication de l'annexine A2 et peut-être des microdomaines lipidiques au cours de troubles dépressifs. Des traitements antidépresseurs augmentent l'expression de S100A10 ainsi que la présence à la membrane plasmique du récepteur 5HT<sub>1B</sub> avec lequel S100A10 interagit directement. A l'inverse, un taux faible de S100A10 provoque une diminution du nombre de récepteurs à la membrane et des comportements de type dépressif (Svenningsson *et al.*, 2006). Or le trafic de récepteurs à la membrane plasmique est un évènement fréquemment associé aux microdomaines lipidiques, et l'intégrité des radeaux est requise pour permettre le maintien de certains récepteurs tels que le récepteur AMPA du glutamate ou le récepteur nicotinique de l'acétylcholine à la surface cellulaire (Hering *et al.*, 2003; Pediconi *et al.*, 2004). On peut donc tout à fait imaginer que la liaison de S100A10 au récepteur 5HT<sub>1B</sub> soit responsable d'un recrutement de l'annexine A2 pour former des microdomaines lipidiques responsables du maintien de ce récepteur à la périphérie cellulaire. Un processus similaire pourrait être envisagé dans les mécanismes de nociception : S100A10 a été impliqué dans le trafic du canal Na<sub>v</sub>1.8 vers la membrane plasmique grâce à une interaction directe entre ces deux protéines (Okuse *et al.*, 2002; Poon *et al.*, 2004) ; des souris transgéniques n'exprimant plus S100A10 dans les neurones sensoriels nocicepteurs présentent un déficit d'expression des canaux Na<sub>v</sub>1.8 dans ces même neurones, ainsi qu'une altération des réponses comportementales à la douleur (Foulkes *et al.*, 2006). Ainsi, élucider les mécanismes de formation et de régulation des microdomaines lipidiques pourrait apporter des éléments de réponse pour expliquer le développement de certaines pathologies, et éventuellement envisager la mise au point de nouveaux traitements thérapeutiques.

# Matériel et méthodes

## I) Culture cellulaire, transfections et mesures de sécrétion

### 1) Mise en culture primaire des cellules chromaffines bovines et transfections

Les cellules chromaffines bovines sont obtenues après digestion de la médullosurrénale par la collagénase de *Clostridium histolyticum* et purification sur un gradient de densité de Percoll (Bader et al., 1986).

Les glandes surrénales de bœuf sont prélevées immédiatement après la mort de l'animal et placées dans une solution de Locke sans calcium (HEPES 5 mM ; NaCl 154 mM ; KCl 5,6 mM ; NaHCO<sub>3</sub> 3,6 mM ; glucose 5,6 mM ; pH 7,4). Les glandes sont ensuite dégraissées et la veine surrénale est canulée pour permettre la perfusion d'une solution de collagénase de *Clostridium histolyticum* de façon rétrograde en circuit fermé pendant 2 heures à 37°C (Locke 13% (vol/vol) dans de l'eau de Volvic, contenant 0.4% de collagénase et 0,5% de BSA). La médullosurrénale est ensuite séparée de la corticosurrénale par dissection, puis les cellules sont dissociées par filtration sur un tamis de 245 µm. Après une centrifugation de 10 minutes à 100g à température ambiante, le culot est repris dans du Locke sans calcium et passé sur un tamis de 82 µm pour dissocier les cellules plus finement. Une centrifugation de 20 minutes à 20000g et à température ambiante sur un gradient continu de densité de Percoll à 47,5% (Pharmacia) permet la purification des cellules chromaffines, en isolant les débris cellulaires et les cellules de la corticosurrénale en haut du gradient et les érythrocytes au fond du gradient.

Les cellules chromaffines sont collectées, puis lavées par dilution et centrifugation 10 minutes à 100g dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium contenant de la glutamine 4 mM et des antibiotiques : streptomycine 100 µg/ml et pénicilline 100 U/ml). Le culot est resuspendu dans du DMEM et les cellules sont comptées à l'aide d'une cellule de Neubauer.

La mise en culture à la densité adéquate est faite dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre, sur des lamelles de 12 mm de diamètre recouvertes de fibronectine pour l'immunocytochimie, et dans des boîtes de 24 puits pour la mesure de sécrétion, dans du

DMEM contenant 10% de sérum fœtal de veau et des antimétabolites (cytosine arabinoside  $10^{-5}$  M, 5-fluorodéoxyuridine  $10^{-5}$  M).

Les cellules sont alors placées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub> et 95% d'air saturé en vapeur d'eau pendant au moins trois jours avant utilisation.

La transfection des cellules est effectuée juste avant la mise en culture.  $5 \cdot 10^6$  cellules sont centrifugées 5 minutes à 100g et le culot est repris dans 100 µl de milieu de transfection supplémenté (Basic nucleofector kit primary neurons, AMAXA) ; 3 µg de plasmide y sont ajoutés, et les cellules sont électroporées avec un électroporateur AMAXA, en utilisant le programme X-001. 500 µl de milieu DMEM contenant 10% de sérum fœtal de veau sont ajoutés aux cellules, et le mélange est réparti sur 4 lamelles de 12 mm de diamètre recouvertes de fibronectine (soit  $1,25 \cdot 10^6$  cellules par puits). Après 12 heures d'incubation à 37°C, le milieu est remplacé par 1 ml de milieu DMEM contenant 10% de sérum fœtal de veau et des antimétabolites (cytosine arabinoside  $10^{-5}$  M, 5-fluorodéoxyuridine  $10^{-5}$  M) et les cellules sont à nouveau mises à incuber au moins 12 heures avant utilisation.

## **2) Mesure de la sécrétion de noradrénaline tritiée par les cellules chromaffines.**

Cette méthode consiste à charger les granules de sécrétion des cellules chromaffines en noradrénaline tritiée, en utilisant le système de recapture du neurotransmetteur, pour pouvoir mesurer la quantité de catécholamines sécrétées après stimulation par un sécrétagogue.

3 µCi de [<sup>3</sup>H]-noradrénaline (Amersham) sont dilués dans 12 ml de tampon S (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,83 mM ; Na pyruvate 0,91 mM ; Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 0,23 µM ; rouge de phénol 39,1 µM ; MgSO<sub>4</sub> 0,74 mM ; KCl 4,91 mM ; CaCl<sub>2</sub> 1,29 mM ; NaCl 20 mM ; NaHCO<sub>3</sub> 8 mM ; HEPES 15 mM ; Sérum de veau fœtal 5% ; glucose 10 mM ; pH 7,3). Les cellules chromaffines sont incubées en présence de noradrénaline tritiée pendant 1 heure à 37°C.

Après 3 lavages de 10 minutes avec du tampon Locke normal, les cellules sont stimulées pendant 5 minutes à 37°C, soit dans une solution de Locke normal contenant 10 µM de nicotine, soit dans une solution de KCl 59 mM (HEPES 14 mM ; NaCl 86,9 mM ; KCl 59 mM ; CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM ; MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM ; EDTA 0,01 mM ; glucose 0,01 mM ; pH 7,5). Le surnageant est transféré dans des cuves à scintillation et mélangé à du liquide de scintillation. Les protéines des cellules restant dans les puits sont précipitées au TCA 10% pendant 20 minutes, puis les cellules sont grattées, transférées dans des tubes et mélangées à du liquide de scintillation.

La mesure de la radioactivité présente dans le milieu d'incubation ou surnageant (S) et de celle restant dans les cellules (C) permet de déterminer le pourcentage de noradrénaline sécrétée par rapport à la quantité totale de noradrénaline présente dans les cellules avant stimulation : % sécrétion =  $S / (S+C)$

## II) Techniques de biologie moléculaire

Ces expériences visaient à générer des mutants de l'annexine A2 incapables de lier l'actine ou le PIP2 à partir d'un plasmide pEGFP-N3 contenant la séquence codante complète de l'annexine A2 fusionnée avec la GFP dans sa partie C-terminale (plasmide Anx2GFP-WT) (Rescher et al 2000), généreusement fourni par le Dr Volker Gerke.

### 1) Génération de mutants de l'annexine A2 ne liant plus l'actine

Les mutants AnxA2- $\Delta$ 9-GFP et AnxA2- $\Delta$ 16-GFP ont été générés par PCR à l'aide de primers contenant les sites de restriction BglIII en 5' (juste en amont du codon start) et SalI en 3' de manière à introduire une délétion des 9 ou des 16 derniers acides aminés (juste après l'Alanine 329 ou la Thréonine 322 respectivement).

L'introduction des sites de restriction a été réalisée lors de l'amplification d'ADN par PCR avec une enzyme Pfu Turbo DNA polymérase (Stratagene) et à l'aide des primers suivants (en souligné : site de restriction BglIII ou SalI, en gras : codon start, Ala<sup>329</sup> ou Thr<sup>322</sup> respectivement) :

Primer sens : 5' TTC CAG ATC TAT **GTC** TAC TGT TCA CG

Primer antisens (AnxA2- $\Delta$ 9) : 5' GGT AGT CGA CCG CTT TCT GGT AGT C

Primer antisens (AnxA2- $\Delta$ 16) : 5' AGT CGT CGA CAG **TGT** CTT GCT GGA TA

Le milieu réactionnel (Tris-HCl 20 mM, pH 8,8, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, KCl 10 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM, Triton-X100 0,1%, BSA sans nucléases 0,1 mg/ml) contient 0,2 mM de chaque dNTP, 0,4 mM des primers correspondants, 20 ng du plasmide Anx2GFP-WT, et 2,5 U de DNA polymérase, dans un volume total de 50  $\mu$ l.

La réaction de PCR a été réalisée avec un thermocycleur (Mastercycler gradient Eppendorf), selon la procédure suivante : 2 minutes de dénaturation à 95°C ; 30 cycles de 30 secondes à 95°C, 30 secondes à 58°C et 6 minutes à 72°C ; 10 minutes d'élongation à 72°C.

Après purification par migration sur gel d'agarose 1% contenant 0,05% de BET dans du TAE (Tris 40 mM, acétate de sodium 5 mM, pH 8, EDTA 1 mM) suivie d'une extraction (kit Qiagen Gel extraction), les produits de PCR et le vecteur pEGFP-N3 ont été soumis à une restriction enzymatique par BglIII/SalI (Biolabs). Les inserts ont ensuite été purifiés au phénol/chloroforme pour éliminer les enzymes, puis insérés par ligation à l'aide de T4 DNA ligase (Invitrogen Gibco) dans le vecteur pEGFP-N3 préalablement linéarisé et purifié. Des bactéries *E. coli* de souche DH5 $\alpha$  ont été transformées avec les produits de ligation par choc thermique (2 min à 42°C puis 2 min sur glace) puis étalées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu de culture LB (Tryptone 10g/l, extrait de levures 5g/l, NaCl 10 g/l, agar-agar 15g/l) supplémenté en kanamycine à 30  $\mu$ g/ml nécessaire à la sélection des transformants. Ceux ayant intégré l'insert sont identifiés par criblage PCR, en utilisant le primer sens et le primer EGFP-N (Clontech). Pour chaque clonage, 3 clones positifs ont été isolés, et les plasmides ont été amplifiés puis purifiés grâce au kit Qiaprep spin miniprep (QIAGEN, selon les instructions du fabricant) pour permettre la vérification de la séquence d'ADN. Parmi ces clones, l'un de ceux contenant la séquence correcte a été utilisé pour amplifier et purifier l'ADN plasmidique en grande quantité avec le kit QIAGEN plasmid maxi, selon le protocole du fournisseur.

## **2) Génération de mutants d'annexine A2 ne liant plus le PIP2**

Les mutants K279A et K281A ont été générés par mutagenèse dirigée à partir du plasmide AnxA2GFP-WT selon le protocole du kit QuikChange II site-directed mutagenesis (Stratagene) avec les primers suivants :

Primer sens (K279A) : 5' GTA TGA CTC CAT GGC GGG CAA GGG GAC GC

Primer antisens (K279A) : 5' GCG TCC CCT TGC CCG CCA TGG AGT CAT AC

Primer sens (K281A) : 5' GAC TCC ATG AAG GGC GCG GGG ACG CGA GAT AAG

Primer antisens (K281A) : 5' CTT ATC TCG CGT CCC CGC GCC CTT CAT GGA GTC

Le protocole PCR utilisé est le suivant : 30 sec de dénaturation à 95°C ; 16 cycles de 30 secondes à 95°C, 1 min à 55°C et 6 minutes à 68°C.

L'élongation est réalisée grâce à la Pfu Ultra High Fidelity DNA polymérase. Les produits de la PCR sont soumis à une digestion enzymatique par DpnI : cette enzyme digère spécifiquement les brins d'ADN parentaux méthylés mais pas les molécules d'ADN néosynthétisées, et celles portant la mutation sont alors sélectionnées par transformation des bactéries XL1-Blue supercompétentes par choc thermique. Les transformants sont

sélectionnés sur milieu LB solide en présence de kanamycine (30 µg/µl). 2 ou 3 clones ont été isolés et les plasmides sont amplifiés et purifiés en utilisant le kit Qiaprep spin miniprep (QIAGEN). L'introduction de la mutation a été vérifiée par séquençage et les plasmides mutés ont été amplifiés et purifiés en grande quantité dans des bactéries *E. coli* DH5α avec le kit QIAGEN plasmid maxi.

### **III) Techniques biochimiques**

#### **1) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, électrotransfert sur membrane de nitrocellulose et immunodétection.**

Cette technique utilise la propriété de protéines chargées à migrer dans un champ électrique essentiellement en fonction de leur taille lorsqu'elles sont dénaturées par le SDS et par chauffage. Le transfert sur membrane de nitrocellulose se fait aussi par une migration des protéines dans un champ électrique, et permet ensuite la détection de protéines particulières par des réactions antigène-anticorps successives.

La séparation des protéines est effectuée selon la méthode de Laemmli (Laemmli, 1970), en utilisant un appareillage Mini-Protean II (Biorad). L'électrophorèse est réalisée en système discontinu comprenant un gel de concentration de 4% d'acrylamide et un gel de séparation de 10, 12%, ou 15% d'acrylamide. Les échantillons mélangés au tampon de charge sont dénaturés par chauffage à 99°C pendant 5 minutes. Après dépôt des échantillons sur le gel, la migration se fait à 50V jusqu'à leur pénétration dans le gel de séparation, puis à 120V pendant 1 à 2 heures en fonction du degré de séparation souhaité, dans un tampon de migration (Tris-HCl 25 mM ; glycine 192 mM ; SDS 0,1% ; pH 8,3). Dans certains cas, des gels en gradient continu de 4 à 20% d'acrylamide (Invitrogen) ont été utilisés avec le système XCell Surelock Mini-Cell (Invitrogen). La migration se fait alors à 125V pendant 1h30 dans le même tampon de migration.

Le transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose est réalisé selon un procédé de transfert humide décrit par Towbin (Towbin et al., 1979), sous l'effet d'un champ électrique de 150V pendant 1 heure, dans un tampon de transfert (Tris-HCl 20 mM ; glycine 155 mM ; SDS 0.02% ; éthanol 20% (vol/vol) ; pH 8,3). Dans le cas des gels en gradient continu, le transfert se fait à 25V pendant 1h30 dans le même tampon. Pour vérifier l'efficacité de

transfert, la membrane est rapidement colorée grâce à une solution de rouge Ponceau (rouge Ponceau 0,5%, acide acétique 1%, éthanol 20%) qui permet de visualiser les protéines.

Pour l'immunodétection des protéines, la membrane est brièvement lavée dans du TBS (Tris-HCl 20 mM ; NaCl 137 mM ; pH 7,6) puis incubée pendant 1 heure, à température ambiante et sous agitation, dans une solution de blocage (TBS contenant 0,1% de Tween-20 et 5% de lait en poudre) pour saturer les sites de liaisons non spécifiques.

La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps primaire dilué dans du tampon de blocage, pendant 2 heures à température ambiante sous agitation.

Après 4 lavages de 5 minutes dans du TBS contenant 0,1% de Tween-20, la membrane est mise en présence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase, dilué dans la solution de blocage, pendant 1 heure à température ambiante et sous agitation.

Après 4 nouveaux lavages de 5 minutes, l'activité de la peroxydase est révélée par chimio-luminescence (ECL Supersignal<sup>®</sup> Substrate System, Pierce) : l'addition d'un substrat de la peroxydase permet une réaction d'oxydoréduction entraînant l'émission de photons par un composé luminescent, le luminol.

L'exposition de la membrane sur un film radiographique (Kodak<sup>®</sup> Biomax Light Film) permet de détecter les protéines reconnues par l'anticorps primaire.

## **2) Révélation du GM1 sur nitrocellulose.**

Le GM1 est un marqueur des micro-domaines lipidiques (Harder et al., 1998). Il peut être détecté grâce à la sous-unité B de la toxine cholérique, qui a la propriété de lier 5 molécules de GM1 (Arosio et al., 2004). Pour déterminer les fractions contenant du GM1 lors des purifications de granules et dans les gradients d'Optiprep<sup>TM</sup>, nous avons utilisé la toxine cholérique couplée à la peroxydase qui peut être révélée par ECL.

1 ou 2 µl de chaque échantillon sont déposés sur une membrane de nitrocellulose. Après séchage, la membrane est incubée pendant une heure à température ambiante dans une solution de blocage (TBS contenant 0,1% de Tween-20 et 5% de lait en poudre) pour saturer les sites de liaisons aspécifiques. La membrane est ensuite incubée en présence de la toxine cholérique couplée à la peroxydase (Sigma), diluée 200 000 fois dans la solution de blocage, pendant 30 minutes à température ambiante sous agitation. Après 4 lavages de 5 minutes, l'activité peroxydase est révélée par ECL.

### 3) Séparation des micro-domaines lipidiques.

Nous avons introduit au laboratoire deux techniques permettant la purification de microdomaines lipidiques, basées sur le même principe : les micro-domaines lipidiques ont la propriété d'être insolubles au Triton-X100 1% à 4°C, alors que les autres fragments de membrane sont solubilisés dans ces conditions ; De plus, la forte teneur en lipides de ces radeaux leur confère une densité faible qui permet de les isoler sur un gradient de densité d'Optiprep™ (Harder et al., 1998) ou de saccharose pour obtenir plus de matériel biologique à analyser.

#### a) *Sur gradient d'Optiprep™.*

10.10<sup>6</sup> cellules par condition expérimentale sont lavées trois fois 10 minutes à 37°C dans une solution de Locke normal (HEPES 14 mM ; NaCl 140 mM ; KCl 4,7 mM ; CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM ; MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM ; EDTA 0.01 mM ; glucose 0,01 mM ; pH 7,5), puis stimulées ou non avec une solution de nicotine 20 µM pendant 10 minutes à 37°C. Les cellules sont alors grattées sur glace en présence de Triton-X100, soit dans 350 µl de tampon de lyse avec calcium (Tris-HCl 10 mM ; NaCl 150 mM ; DTT 1 mM ; CaCl<sub>2</sub> 100 µM ; Triton-X100 1% ; mélange d'inhibiteurs de protéases 4%) pour les cellules qui ont été stimulées, soit dans 350 µl de tampon de lyse EGTA (Tris-HCl 10 mM ; NaCl 150 mM ; DTT 1 mM ; EGTA 5 mM ; Triton-X100 1% ; mélange d'inhibiteurs de protéases 4%) pour les cellules non stimulées. Après une demi-heure à 4°C, 400 µl de suspension cellulaire (350 µl de tampon + 50 µl de cellules) sont mélangés à 800 µl d'Optiprep™ (Nycomed-Pharma, Oslo, Norway) à 60% pour obtenir une solution à 40%. 1 ml de ce mélange est transféré dans un tube à centrifugation (le restant constituant la fraction de lysat), puis recouvert successivement de 1 ml des solutions d'Optiprep™ : 35%, 30%, 20%, et enfin 5%, de manière à former un gradient de densité discontinu. Les gradients sont centrifugés 17 heures dans un rotor SW50.1 à 34000 rpm et à 4°C. 10 fractions de 500 µl sont récupérées à partir du haut de gradient. 20 µl de chaque fraction sont prélevés pour détecter la présence du GM1 par dot blot. Les protéines contenues dans le restant des fractions sont précipitées au TCA 10% (acide trichloracétique). Après centrifugation 10 minutes à 14000 rpm (Centrifugeuse 5417R Eppendorf), les culots subissent 3 cycles de lavage à l'acétone 80% de 10 minutes, séparés par des centrifugations de 10 minutes à 14000 rpm. Les culots sont alors repris dans du tampon de charge (Tris-HCl 125 mM ; pH 6,8 ; glycérol 10% ; SDS 3% ; DTT 0,1 M ; bleu de bromophénol 0.001%) et analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions

dénaturantes, suivie d'un électrotransfert sur membrane de nitrocellulose et d'une immunodétection.

Au préalable, un dosage de Bradford (Bradford, 1976) est réalisé sur les lysats cellulaires avec le réactif de Bradford (Biorad Protein Assay) pour déterminer leur concentration protéique et permettre le dépôt sur gel de la même quantité de protéines, afin de pouvoir comparer les différentes conditions.

*b) Sur gradient de saccharose.*

$20 \cdot 10^6$  cellules par condition sont lavées trois fois 10 minutes dans une solution de Locke normal à 37°C, puis stimulées ou non avec une solution de nicotine 20  $\mu\text{M}$  pendant 10 minutes à 37°C. Les cellules sont alors grattées sur glace dans 350  $\mu\text{l}$  d'HB/CLAP (saccharose 250 mM, HEPES 10 mM, pH 7,4, mélange d'inhibiteurs de protéases 0,2%, EGTA 1 mM pour les cellules au repos ou  $\text{CaCl}_2$  100  $\mu\text{M}$  pour les cellules stimulées). Après broyage mécanique des cellules, 500  $\mu\text{l}$  d'HB/CLAP contenant 2% de Triton-X100 sont ajoutés à 500  $\mu\text{l}$  du broyat, et le mélange est incubé pendant 30 minutes à 4°C. La concentration protéique des échantillons est évaluée par un dosage de Bradford, de façon à standardiser les échantillons à des concentrations déterminées. 1,87 ml de tampon 1 (saccharose 56%, HEPES 10 mM, pH 7,4, EGTA 1 mM ou  $\text{CaCl}_2$  100  $\mu\text{M}$ ) sont ajoutés à 880  $\mu\text{l}$  de suspension cellulaire. Après transfert dans des tubes de centrifugation, le mélange est recouvert de 7,81 ml de tampon 2 (saccharose 38%, HEPES 10 mM, pH 7,4, EGTA 1 mM ou  $\text{CaCl}_2$  100  $\mu\text{M}$ ) puis de 0,44 ml de tampon 3 (saccharose 5%, HEPES 10 mM, pH 7,4, EGTA 1 mM ou  $\text{CaCl}_2$  100  $\mu\text{M}$ ). Les gradients sont centrifugés pendant 18 heures dans un rotor Kontron SW41 à 39000 rpm et à 4°C. Onze fractions de 1ml sont récupérées à partir du haut de gradient. 20  $\mu\text{l}$  de chaque fraction sont prélevés pour détecter la présence du GM1 par dot blot. Les protéines contenues dans les fractions sont précipitées au TCA 10% (acide trichloracétique) puis les culots sont lavés à l'acétone à 80%, repris dans le tampon de charge comme précédemment et analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, suivie d'un électrotransfert sur membrane de nitrocellulose et d'une immunodétection.

#### 4) Purification de granules de sécrétion

##### a) *Sur coussin de saccharose.*

Cette technique est basée sur la différence de densité existant entre les différents organites. Les fragments de membranes plasmiques, cassées par le broyage des cellules chromaffines, et les granules à cœur dense, restés intacts, peuvent ainsi être isolés sur un coussin de densité de saccharose.

100.10<sup>6</sup> cellules sont lavées trois fois 10 minutes dans une solution de Locke normal à 37°C. Après stimulation ou non avec une solution de nicotine 20 µM pendant 5 minutes à 37°C, les cellules sont grattées dans 3 ml de tampon A (saccharose 0,32 M ; Tris-HCl 10 mM ; EGTA 1 mM ; pH 7,4) additionné extemporanément d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases à 1% final (Sigma), et broyées à l'aide d'un potter (RZR 2102 control Heidolph ; 40 aller-retours à 1200 rpm) à 4°C. 100 µl de chaque fraction sont prélevés et constituent les fractions de broyat. Le broyat est centrifugé 12 minutes à 5000 rpm (centrifugeuse TL100 Beckman ; rotor TLA-110) à 4°C, pour éliminer les noyaux et les cellules non lysées. Les surnageants sont centrifugés 20 minutes à 22000 rpm à 4°C. Le culot contenant les granules de sécrétion et les fragments de membrane est repris dans 250 µl de tampon A (fraction « culot 1 »), puis déposé sur un gradient discontinu de saccharose composé de 1,5 ml de tampon B (saccharose 1,6 M ; Tris-HCl 10 mM ; EGTA 1 mM ; pH 7,4) puis de 1,5 ml de tampon C (saccharose 1 M ; Tris-HCl 10 mM ; EGTA 1 mM ; pH 7,4). Après une centrifugation de 90 minutes à 49000 rpm à 4°C (TL100 Beckman ; rotor TLA-110) pour permettre la séparation des membranes plasmiques et des granules, 150 µl à partir du haut du gradient sont éliminés et une fraction de 2 ml contenant les membranes est prélevée (fraction MP). Le culot, contenant les granules, est repris dans 150 µl de Tris-HCl 10 mM pH 7,4. Les échantillons sont congelés à -20°C, puis décongelés, pour faire éclater les granules. Une centrifugation de 20 minutes à 22000 rpm à 4°C permet d'isoler les membranes de granules dans les culots (fraction MG). Ces culots sont repris dans 50 µl de Tris 10 mM pH 7,4.

Un dosage de Bradford permet de déterminer la concentration protéique de tous les échantillons. Ceux-ci sont alors tous ajustés à la même concentration protéique, puis testés pour révéler la présence de GM1 par dot blot.

#### *b) Sur gradient continu de saccharose*

Le principe est identique à celui de la purification sur coussin de saccharose, mais cette technique permet une séparation plus fine des granules et des membranes. Les cellules sont homogénéisées dans un tampon de saccharose 0,32M, Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 et centrifugées 15 minutes à 800 g. Le surnageant (lysat cellulaire) est à nouveau centrifugé pendant 20 minutes à 20000 g et le culot est resuspendu dans le tampon de saccharose 0,32M, puis déposé sur un gradient de densité continu de saccharose (de 1 à 2,2M de saccharose dans 10mM de Tris-HCl, pH 7,4). Après une centrifugation de 90 minutes à 100000g, 12 fractions de 1 ml sont collectées à partir du haut du gradient. Leur concentration protéique est évaluée par un test de Bradford, et les fractions 2 à 12 sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, suivie d'un électrotransfert sur membrane de nitrocellulose et d'une immunodétection. La SNAP-25 et la chromogranine A servent de marqueurs pour la détection des fractions contenant les membranes plasmiques et les granules respectivement.

### **5) Co-précipitation *in vitro* de la protéine S100A10 avec la VAMP2 fusionnée à la GST**

Cette expérience permet de déterminer si des protéines sont capables d'interagir directement. Des billes de glutathion-sépharose, sur lesquelles la GST-VAMP2 est fixée par affinité entre la GST et le glutathion, sont incubées en présence de S100A10 purifiée. Si ces deux protéines interagissent, S100A10 est retenue sur les billes de GST-VAMP2, et précipite avec elles lors de la centrifugation. Les protéines qui n'interagissent pas restent en solution dans le surnageant.

#### *a) Production et purification de la protéine S100A10*

Cette technique permet de produire la protéine S100A10 en grande quantité dans des bactéries, puis de la purifier par différentes étapes de chromatographie, afin d'obtenir une fraction pure de S100A10 pour l'expérience de co-précipitation *in vitro*. J'ai effectué la mise au point de cette technique au laboratoire.

Le vecteur d'expression de la protéine S100A10, dérivé du vecteur pET-23a, a été généreusement fourni par le Dr. Jesus Ayala-Sanmartin (Ayala-Sanmartin et al., 2000). Des bactéries *Escherichia coli* de souche BL21 sont cultivées dans du milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline, jusqu'à une densité optique à 600 nm de 0,6. Ensuite, l'expression de

S100A10 est induite avec 1 mM d'IPTG pendant 3h à 37°C. Après centrifugation pendant 25 minutes à 5000 rpm dans un rotor Sorvall SLA1500, le culot est resuspendu dans du tampon de lyse (100 mM Tris, pH 7,5, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, cocktail d'inhibiteurs de protéases), puis soniqué 6 fois 10 secondes. Le lysat est centrifugé 10 minutes à 10000 rpm dans un rotor Sorvall SA600, et les protéines du surnageant sont précipitées par addition de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-SO<sub>4</sub> à 50% de saturation (p/v) pendant 15 minutes à 4°C. L'augmentation de force ionique provoque une précipitation différentielle des protéines en fonction de leur polarité, car les ions entrent en compétition avec les protéines pour les molécules d'eau qui les hydratent (phénomène de *salting-out*). S100A10 ne précipite pas et reste donc dans le surnageant. Après une centrifugation de 15 minutes à 15000 rpm dans le rotor Sorvall SA600, le surnageant a été déposé sur une résine de butyl-sépharose qui permet de retenir les protéines hydrophobes. La résine est lavée par des bains successifs avec du tampon de lyse saturé en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-SO<sub>4</sub> à 50%, 40%, 30% 20% 10% et 0% pour permettre l'élution par paliers des différents composés retenus sur la colonne. Les dernières fractions, contenant la S100A10, sont dialysées dans du tampon DE52 (10 mM imidazole, pH 7.4, 30 mM NaCl, 1 mM EGTA, 0.1 mM EDTA), puis y sont ajoutés 0,5 mM de DTT avant de les appliquer sur une colonne de DEAE-cellulose, échangeuse d'anions. S100A10 n'est pas retenue sur cette colonne, n'étant pas chargée négativement à ce pH. Les fractions correspondant au volume mort et contenant S100A10 (la purification est suivie par lecture de la densité optique à 280 nm) sont dialysées dans du tampon PBS, concentrées dans un concentrateur 1 kD (Macrosep centrifugal device), et stockées à -20°C en aliquots. Toutes les étapes de purification ont été vérifiées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, suivie d'une coloration au bleu de Coomassie ou d'un électrotransfert sur membrane de nitrocellulose et d'une immunodétection.

#### *b) Production de la GST-VAMP2<sub>1-96</sub> et co-précipitation*

Le vecteur d'expression de la protéine de fusion GST-VAMP2<sub>1-96</sub> (Quetglas et al., 2000) a été généreusement fourni par Michael Seagar. Le vecteur commercial pGEX-4T1 a été utilisé pour produire la GST non fusionnée. Des bactéries *Escherichia coli* de souche BL21 sont cultivées dans du milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline, jusqu'à atteindre une densité optique à 600 nm de 0,75. L'expression de la GST ou de la protéine de fusion est induite avec 1 mM d'IPTG pendant 2h 30 à 37°C. Après centrifugation pendant 20 minutes à 5000 rpm dans un rotor Sorvall SLA1500, le culot est resuspendu dans du tampon PBS

contenant 5 mM DTT et un cocktail d'inhibiteurs de protéases à 0,5% final (Sigma). Après sonication 6 fois 10 secondes et traitement au Triton-X100 1% pendant 30 minutes à 4°C, le lysat cellulaire est centrifugé pendant 15 minutes à 10000 rpm à 4°C, dans un rotor Sorvall SA600. Les protéines recombinantes ou la GST présentes dans le surnageant sont purifiées avec des billes Glutathione-sépharose 4B (Amersham Biosciences) selon le protocole fourni. La production de protéine et la purification sont vérifiées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, suivie d'une coloration au bleu de Coomassie ou d'un électrotransfert sur membrane de nitrocellulose et d'une immunodétection.

Les billes GST et GST-VAMP2 sont lavées 3 fois avec du tampon de précipitation (40 mM Hepes, pH 7,4, 100 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% NP40), puis saturées à 4°C pendant 12 heures avec du tampon de précipitation contenant 0,75% de BSA. Pendant ce temps, des échantillons contenant différentes quantités de S100A10 purifiée (0,75 µg, 1,5 µg ou 3 µg, tampon de précipitation 1X) sont incubées pendant 12h à 4°C avec des billes de Glutathione-sépharose 4B, pour minimiser les interactions non-spécifiques (*pre-clearing*). Après centrifugation pour éliminer ces billes, les fractions de S100A10 ont été mises en présence de 15 µg de GST ou de GST-VAMP2 immobilisées sur billes, pendant 3 heures à 4°C. Après centrifugation pendant 1 minute à 800 rpm pour précipiter les billes, celles-ci sont lavées deux fois avec 500 µl de tampon de précipitation, puis reprises dans le tampon de charge et analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, suivie d'un électrotransfert sur membrane de nitrocellulose et d'une immunodétection.

## **IV) Techniques de microscopie**

### **1) Cytochimie et microscopie confocale**

#### *a) Marquages cytochimiques*

Cette technique est utilisée pour déterminer la localisation subcellulaire d'une molécule d'intérêt en la marquant spécifiquement à l'aide d'anticorps ou d'une toxine couplé à des molécules fluorescentes visualisables en microscopie de fluorescence. Il est également possible de déterminer la colocalisation de plusieurs molécules et l'association à un compartiment cellulaire particulier.

Les cellules chromaffines, cultivées pendant au moins trois jours sur des lamelles de verre recouvertes de fibronectine, sont lavées 4 fois 5 minutes dans du Locke normal à 37°C.

Elles sont alors stimulées, le cas échéant, avec une solution de nicotine 20µM dans du Locke normal ou une solution de KCl 59 mM pendant 10 minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite fixées avec du paraformaldéhyde froid à 4% (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 120 mM ; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 120 mM ; paraformaldéhyde 4% ; pH 7,2) pendant 15 minutes à température ambiante, puis avec du paraformaldéhyde 4% contenant 0,1% de Triton-X100 pendant 10 minutes à température ambiante, pour perméabiliser les membranes. Après 4 lavages de 5 minutes dans du PBS (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,95 mM ; NaCl 0,9% ; pH 7,5), les sites de liaison non spécifiques sont saturés dans du PBS contenant 3% de BSA (bovine serum albumin) et 10% de sérum de chèvre, pendant 2 heures à 37°C ou toute la nuit à 4°C. Si nécessaire, le sérum de chèvre peut être remplacé par 10% de sérum d'âne pour éviter les réactions croisées avec des anticorps secondaires anti-protéines de chèvre.

Les cellules sont ensuite incubées avec les anticorps primaires dilués dans du PBS contenant 3% de BSA pendant 1 à 2 heures à 37°C.

Après 6 lavages de 5 minutes dans du PBS, les cellules sont incubées avec les anticorps secondaires couplés à différents fluorophores (Alexa 488, Alexa 555, ou Alexa 647) dilués dans du PBS-BSA 3% pendant 45 minutes à température ambiante et à l'obscurité.

Pour marquer les filaments d'actine, les lamelles sont lavées 6 fois 5 minutes au PBS, puis incubées avec la phalloïdine couplée à la tétraméthylrhodamine B isothiocyanate (TRITC) ou à l'Alexa 647, pendant 15 minutes à température ambiante, à l'obscurité.

Les lamelles sont à nouveau lavées 6 fois dans du PBS, puis rapidement rincées dans l'eau, séchées, et montées sur lames à l'abri de la lumière dans un milieu de montage adapté à l'observation en microscopie confocale : le milieu Elvanol-Mowiol (Mowiol 4-88 ; France Biochem 85).

Les marquages des microdomaines lipidiques sont réalisés avec la toxine cholérique couplée à un fluorophore (Alexa 488, Alexa 555 ou Alexa 633, Molecular Probes), ajoutée à 8 µl/ml dans la solution de stimulation. La détection des sites d'exocytose se fait par addition pendant la stimulation d'un anticorps dirigé contre la dopamine β hydroxylase, présente sur la face interne de la membrane des granules et accessible aux anticorps uniquement lorsque les membranes plasmique et granulaire ont fusionné. Les cellules sont ensuite fixées avec du paraformaldéhyde à 4% mais non perméabilisées, puis saturées dans du PBS/BSA 3%, et l'incubation avec l'anticorps secondaire couplé avec un fluorophore est réalisée comme précédemment.

### *b) Microscopie confocale.*

Le microscope confocal à balayage laser (ZEISS LSM510) permet d'effectuer des coupes virtuelles de 0,2 à 0,3  $\mu\text{m}$  dans l'échantillon observé et de n'enregistrer que l'image de la fluorescence émise dans un plan. La fluorescence parasite émise dans les plans focaux supérieurs et inférieurs est alors limitée. Cette technique permet également la visualisation simultanée de plusieurs marquages sur une même image, et donc par exemple la détermination de l'association d'une protéine à une structure cellulaire.

Le microscope utilisé comporte un laser Hélium/Néon ( $\lambda = 543 \text{ nm}$ ), excitateur de l'Alexa 555 et du TRITC qui sont des fluorochromes émettant dans le rouge ; un laser Hélium/Néon ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ), excitateur de l'Alexa 647 qui émet dans l'ultra-rouge, et un laser Argon ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ), excitateur de l'Alexa 488 et de la GFP qui émettent dans le vert. Les coupes virtuelles sont réalisées au niveau du noyau pour obtenir une image du plan médian de la cellule.

Sur les images numériques de microscopie confocale, le nombre de pixels correspondant aux marquages par la toxine cholérique ou par la phalloïdine a été mesuré en utilisant le logiciel Zeiss CLSM instrument 3.2, puis normalisé par rapport à la surface totale de chaque cellule, pour permettre de comparer les différentes conditions. La proportion d'actine colocalisée avec les microdomaines lipidiques a été estimée à partir du nombre de pixels jaunes, correspondant à une colocalisation des deux marquages, divisé par le nombre de pixels rouges, correspondant au marquage par la phalloïdine, et exprimé en pourcentage. Dans les deux cas, la significativité entre les différentes conditions a été évaluée par un test t de Student.

## **2) Feuilletts de membrane plasmique, microscopie électronique à transmission et analyses statistiques.**

Cette technique permet de visualiser à l'échelle ultrastructurale la face interne de la membrane plasmique d'une cellule ainsi que les organites et molécules qui y sont rattachés. Elle permet notamment d'observer l'organisation latérale de la membrane en nanodomaines et microdomaines lipidiques. De plus, des analyses statistiques permettent de quantifier la formation d'agrégats de molécules et de déterminer avec précision des colocalisations. C'est pourquoi nous avons introduit cette technique au laboratoire.

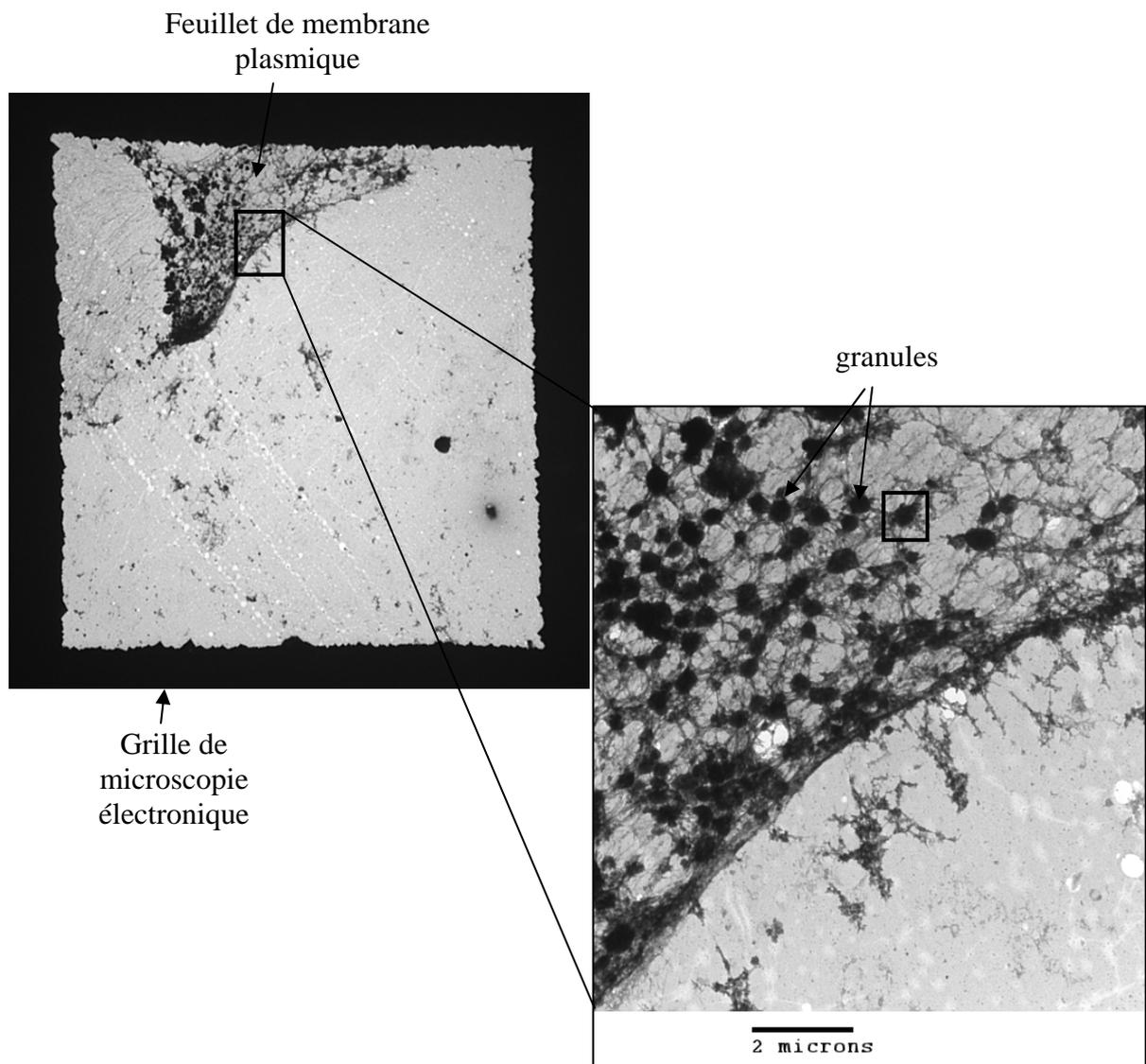
*a) Préparation des feuillets de membrane plasmique et observation en microscopie électronique.*

Pour la préparation de feuillets de membrane plasmique, des grilles de microscopie électronique en nickel recouvertes de Formvar et fixées sur des lamelles de verre sont appliquées à l'envers sur des cellules chromaffines mises en culture sur des lamelles de verre recouvertes de fibronectine. Ces cellules sont préalablement stimulées ou non avec une solution de nicotine 20  $\mu\text{M}$ . Lorsque l'expérience le requiert, un marquage du GM1 est réalisé à l'aide de toxine cholérique biotinylée pendant la stimulation. Une forte pression est appliquée sur les grilles à l'aide d'un bouchon de liège pendant 20 secondes. Les grilles sont ensuite retirées, arrachant des fragments de la membrane plasmique des cellules qui y adhèrent. On obtient ainsi des feuillets de membrane plasmique dont la face cytoplasmique se trouve vers le haut (figure 35). L'ensemble du processus est réalisé en moins de 30 secondes. Les feuillets sont ensuite fixés avec du paraformaldéhyde à 2% pendant 10 minutes à 4°C. Après saturation des sites aspécifiques avec du PBS contenant 3% de BSA, 5% de sérum de chèvre, et 0,1% de gélatine, des immunomarquages sont réalisés avec des anticorps primaires anti-S100A10, anti-VAMP2 ou anti-actine et révélés avec des anticorps secondaires ou avec la streptavidine (pour révéler les marquages à la toxine cholérique le cas échéant), couplés à différentes tailles de billes d'or colloïdal. Après fixation au glutaraldéhyde 2% dans du PBS, les échantillons sont post-fixés avec 1% de tétraoxyde d'osmium ( $\text{OsO}_4$ ), déshydratés à l'éthanol par plusieurs bains de degrés alcooliques croissants, traités à l'hexaméthylsilazane et séchés à l'air. Les observations sont réalisées grâce à un microscope électronique à transmission Hitachi 7500. Deux expériences indépendantes ont été menées, avec des résultats similaires. Les données des deux expériences sont mises en commun pour les études statistiques. Pour chaque condition, 50 images correspondant à 50  $\mu\text{m}^2$  de membrane plasmique ont été analysées (Wilson et al., 2004).

*b) Analyse statistique de la distribution des marquages par la fonction K de Ripley.*

Les images numériques des feuillets de membrane plasmique marqués ont été traitées pour éliminer le bruit de fond, et les coordonnées (x, y) des toutes les particules d'or ont été déterminées grâce à un plug-in du logiciel Image J.

La fonction K univariée de Ripley utilise ces coordonnées pour déterminer si les billes d'or sont organisées en agrégats, dispersées ou réparties aléatoirement. La fonction K(r) est définie comme suit :  $K(r) = N(r)/\lambda$  ou N(r) est le nombre de voisins à une distance inférieure à



**Figure 35 : Image d'un feuillet de membrane plasmique en microscopie électronique.** L'image montre la surface interne d'un feuillet de membrane plasmique d'une cellule stimulée, vue à faible grossissement. Sur l'agrandissement, on distingue les granules, apparaissant très denses aux électrons. Le cadre dans l'agrandissement montre la taille des images de microscopie électronique que nous avons utilisée pour nos études.

$r$ , et  $\lambda$  est l'intensité du nuage de points, c'est à dire le nombre de points par unité de surface. Pour une distribution aléatoire, on a  $K(r) = \pi r^2$ , alors que si  $K(r) > \pi r^2$ , les particules ont plus de voisins que prévu par la distribution aléatoire c'est à dire qu'elles forment des agrégats. La fonction peut être linéarisée et on définit  $L(r) = \sqrt{(K(r)/\pi)}$  avec un intervalle de confiance de  $99\% \pm 1$ . Dans ces conditions,  $-1 < L(r) - r < 1$  si la distribution est aléatoire, et  $L(r) - r > 1$  si les particules forment des agrégats.

Une modification de cette fonction en une fonction bivariée permet de définir les relations spatiales de particules d'or de deux tailles différentes, et donc de déterminer la colocalisation de deux protéines en analysant la formation d'agrégats regroupant les deux types de billes. Dans ce cas, la fonction  $K_{biv}(r)$  tient compte des distances entre les grosses billes et chacune des petites billes, et inversement. On définit comme précédemment la fonction linéarisée  $L_{biv}(r)$ , avec un intervalle de confiance de  $95\% \pm 1$ . Si  $-1 < L_{biv}(r) - r < 1$ , les billes ne sont pas colocalisées, alors qu'elles le sont pour  $L_{biv}(r) - r > 1$ .

Pour ces deux types d'études (existence d'agrégats et étude de colocalisation), une macro Excel écrite sous Visual Basic nous a été généreusement fournie par JF Hancock (Prior et al., 2003).



## Références bibliographiques

### A

- Ali, S. M., Geisow, M. J. and Burgoyne, R. D.** (1989). A role for calpactin in calcium-dependent exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Nature* **340**, 313-5.
- Allen, J. A., Halverson-Tamboli, R. A. and Rasenick, M. M.** (2007). Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat Rev Neurosci* **8**, 128-40.
- 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**, 2424-38.
- Aman, M. J. and Ravichandran, K. S.** (2000). A requirement for lipid rafts in B cell receptor induced Ca(2+) flux. *Curr Biol* **10**, 393-6.
- Apps, D. K.** (1997). Membrane and soluble proteins of adrenal chromaffin granules. *Semin Cell Dev Biol* **8**, 121-31.
- Arosio, D., Vrasidas, I., Valentini, P., Liskamp, R. M., Pieters, R. J. and Bernardi, A.** (2004). Synthesis and cholera toxin binding properties of multivalent GM1 mimics. *Org Biomol Chem* **2**, 2113-24.
- Ashery, U., Varoqueaux, F., Voets, T., Betz, A., Thakur, P., Koch, H., Neher, E., Brose, N. and Rettig, J.** (2000). Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells. *Embo J* **19**, 3586-96.
- Aunis, D. and Bader, M. F.** (1988). The cytoskeleton as a barrier to exocytosis in secretory cells. *J Exp Biol* **139**, 253-66.
- Aunis, D. and Langley, K.** (1999). Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Acta Physiol Scand* **167**, 89-97.
- Awasthi-Kalia, M., Schnetkamp, P. P. and Deans, J. P.** (2001). Differential effects of filipin and methyl-beta-cyclodextrin on B cell receptor signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **287**, 77-82.
- Ayala-Sanmartin, J., Gouache, P. and Henry, J. P.** (2000). N-Terminal domain of annexin 2 regulates Ca(2+)-dependent membrane aggregation by the core domain: a site directed mutagenesis study. *Biochemistry* **39**, 15190-8.
- Ayala-Sanmartin, J., Henry, J. P. and Pradel, L. A.** (2001). Cholesterol regulates membrane binding and aggregation by annexin 2 at submicromolar Ca(2+) concentration. *Biochim Biophys Acta* **1510**, 18-28.

### B

- Babiychuk, E. B. and Draeger, A.** (2000). Annexins in cell membrane dynamics. Ca(2+)-regulated association of lipid microdomains. *J Cell Biol* **150**, 1113-24.
- Babiychuk, E. B., Monastyrskaya, K., Burkhard, F. C., Wray, S. and Draeger, A.** (2002). Modulating signaling events in smooth muscle: cleavage of annexin 2 abolishes its binding to lipid rafts. *Faseb J* **16**, 1177-84.
- Babiychuk, E. B., Palstra, R. J., Schaller, J., Kampfer, U. and Draeger, A.** (1999). Annexin VI participates in the formation of a reversible, membrane-cytoskeleton complex in smooth muscle cells. *J Biol Chem* **274**, 35191-5.

- Bader, M. F., Doussau, F., Chasserot-Golaz, S., Vitale, N. and Gasman, S.** (2004). Coupling actin and membrane dynamics during calcium-regulated exocytosis: a role for Rho and ARF GTPases. *Biochim Biophys Acta* **1742**, 37-49.
- Bader, M. F., Holz, R. W., Kumakura, K. and Vitale, N.** (2002). Exocytosis: the chromaffin cell as a model system. *Ann NY Acad Sci* **971**, 178-83.
- Bader, M. F., Thierse, D., Aunis, D., Ahnert-Hilger, G. and Gratzl, M.** (1986). Characterization of hormone and protein release from alpha-toxin-permeabilized chromaffin cells in primary culture. *J Biol Chem* **261**, 5777-83.
- Bandorowicz-Pikula, J.** (2000). Lipid-binding proteins as stabilizers of membrane microdomains--possible physiological significance. *Acta Biochim Pol* **47**, 553-64.
- Barclay, J. W., Morgan, A. and Burgoyne, R. D.** (2005). Calcium-dependent regulation of exocytosis. *Cell Calcium* **38**, 343-53.
- Bargagna-Mohan, P., Hamza, A., Kim, Y. E., Khuan Abby Ho, Y., Mor-Vaknin, N., Wendschlag, N., Liu, J., Evans, R. M., Markovitz, D. M., Zhan, C. G. et al.** (2007). The tumor inhibitor and antiangiogenic agent withaferin A targets the intermediate filament protein vimentin. *Chem Biol* **14**, 623-34.
- Becherer, U. and Rettig, J.** (2006). Vesicle pools, docking, priming, and release. *Cell Tissue Res* **326**, 393-407.
- Becker, T., Weber, K. and Johnsson, N.** (1990). Protein-protein recognition via short amphiphilic helices; a mutational analysis of the binding site of annexin II for p11. *Embo J* **9**, 4207-13.
- Benaud, C., Gentil, B. J., Assard, N., Court, M., Garin, J., Delphin, C. and Baudier, J.** (2004). AHNAK interaction with the annexin 2/S100A10 complex regulates cell membrane cytoarchitecture. *J Cell Biol* **164**, 133-44.
- Berendes, R., Voges, D., Demange, P., Huber, R. and Burger, A.** (1993). Structure-function analysis of the ion channel selectivity filter in human annexin V. *Science* **262**, 427-30.
- Bhalla, A., Tucker, W. C. and Chapman, E. R.** (2005). Synaptotagmin isoforms couple distinct ranges of Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, and Sr<sup>2+</sup> concentration to SNARE-mediated membrane fusion. *Mol Biol Cell* **16**, 4755-64.
- Biener, Y., Feinstein, R., Mayak, M., Kaburagi, Y., Kadowaki, T. and Zick, Y.** (1996). Annexin II is a novel player in insulin signal transduction. Possible association between annexin II phosphorylation and insulin receptor internalization. *J Biol Chem* **271**, 29489-96.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Briggs, J. A., Wilk, T. and Fuller, S. D.** (2003). Do lipid rafts mediate virus assembly and pseudotyping? *J Gen Virol* **84**, 757-68.
- Brown, D. A.** (2006). Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology (Bethesda)* **21**, 430-9.
- Brown, D. A. and Rose, J. K.** (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**, 533-44.
- Brown, S. S.** (1999). Cooperation between microtubule- and actin-based motor proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 63-80.
- Brownawell, A. M. and Creutz, C. E.** (1997). Calcium-dependent binding of sorcin to the N-terminal domain of synexin (annexin VII). *J Biol Chem* **272**, 22182-90.
- Burger, A., Berendes, R., Liemann, S., Benz, J., Hofmann, A., Gottig, P., Huber, R., Gerke, V., Thiel, C., Romisch, J. et al.** (1996). The crystal structure and ion channel activity of human annexin II, a peripheral membrane protein. *J Mol Biol* **257**, 839-47.
- Burgoyne, R. D. and Morgan, A.** (1998a). Analysis of regulated exocytosis in adrenal chromaffin cells: insights into NSF/SNAP/SNARE function. *Bioessays* **20**, 328-35.

**Burgoyne, R. D. and Morgan, A.** (1998b). Calcium sensors in regulated exocytosis. *Cell Calcium* **24**, 367-76.

**Burgoyne, R. D. and Morgan, A.** (2003). Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev* **83**, 581-632.

## C

**Caohuy, H. and Pollard, H. B.** (2002). Protein kinase C and guanosine triphosphate combine to potentiate calcium-dependent membrane fusion driven by annexin 7. *J Biol Chem* **277**, 25217-25.

**Caohuy, H., Srivastava, M. and Pollard, H. B.** (1996). Membrane fusion protein synexin (annexin VII) as a Ca<sup>2+</sup>/GTP sensor in exocytotic secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10797-802.

**Caroni, P.** (2001). New EMBO members' review: actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P(2) rafts. *Embo J* **20**, 4332-6.

**Chamberlain, L. H.** (2004). Detergents as tools for the purification and classification of lipid rafts. *FEBS Lett* **559**, 1-5.

**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**, 5619-24.

**Chan, H. C., Kaetzel, M. A., Gotter, A. L., Dedman, J. R. and Nelson, D. J.** (1994). Annexin IV inhibits calmodulin-dependent protein kinase II-activated chloride conductance. A novel mechanism for ion channel regulation. *J Biol Chem* **269**, 32464-8.

**Chander, A., Sen, N., Naidu, D. G. and Spitzer, A. R.** (2003). Calcium ionophore and phorbol ester increase membrane binding of annexin a7 in alveolar type II cells. *Cell Calcium* **33**, 11-7.

**Chapman, E. R.** (2002). Synaptotagmin: a Ca(2+) sensor that triggers exocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 498-508.

**Chapman, L. P., Epton, M. J., Buckingham, J. C., Morris, J. F. and Christian, H. C.** (2003). Evidence for a role of the adenosine 5'-triphosphate-binding cassette transporter A1 in the externalization of annexin I from pituitary folliculo-stellate cells. *Endocrinology* **144**, 1062-73.

**Chasserot-Golaz, S., Hubert, P., Thierse, D., Dirrig, S., Vlahos, C. J., Aunis, D. and Bader, M. F.** (1998). Possible involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in regulated exocytosis: studies in chromaffin cells with inhibitor LY294002. *J Neurochem* **70**, 2347-56.

**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**, 1217-36.

**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**, 1108-19.

**Chattopadhyay, S., Sun, P., Wang, P., Abonyo, B., Cross, N. L. and Liu, L.** (2003). Fusion of lamellar body with plasma membrane is driven by the dual action of annexin II tetramer and arachidonic acid. *J Biol Chem* **278**, 39675-83.

**Cheney, R. E. and Willard, M. B.** (1989). Characterization of the interaction between calpactin I and fodrin (non-erythroid spectrin). *J Biol Chem* **264**, 18068-75.

**Chieregatti, E. and Meldolesi, J.** (2005). Regulated exocytosis: new organelles for non-secretory purposes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 181-7.

- Chintagari, N. R., Jin, N., Wang, P., Narasaraju, T. A., Chen, J. and Liu, L.** (2006). Effect of cholesterol depletion on exocytosis of alveolar type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **34**, 677-87.
- Cockcroft, S., Way, G., O'Lunaigh, N., Pardo, R., Sarri, E. and Fensome, A.** (2002). Signalling role for ARF and phospholipase D in mast cell exocytosis stimulated by crosslinking of the high affinity FcεR1 receptor. *Mol Immunol* **38**, 1277-82.
- Creutz, C. E., Dowling, L. G., Sando, J. J., Villar-Palasi, C., Whipple, J. H. and Zaks, W. J.** (1983). Characterization of the chromobindins. Soluble proteins that bind to the chromaffin granule membrane in the presence of Ca<sup>2+</sup>. *J Biol Chem* **258**, 14664-74.
- Creutz, C. E., Pazoles, C. J. and Pollard, H. B.** (1978). Identification and purification of an adrenal medullary protein (synexin) that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules. *J Biol Chem* **253**, 2858-66.
- Crompton, M. R., Moss, S. E. and Crumpton, M. J.** (1988). Diversity in the lipocortin/calpactin family. *Cell* **55**, 1-3.
- Cuchillo-Ibanez, I., Albillos, A., Aldea, M., Arroyo, G., Fuentealba, J. and Garcia, A. G.** (2002). Calcium entry, calcium redistribution, and exocytosis. *Ann N Y Acad Sci* **971**, 108-16.

## D

- Danielsen, E. M., van Deurs, B. and Hansen, G. H.** (2003). "Nonclassical" secretion of annexin A2 to the luminal side of the enterocyte brush border membrane. *Biochemistry* **42**, 14670-6.
- Darchen, F. and Goud, B.** (2000). Multiple aspects of Rab protein action in the secretory pathway: focus on Rab3 and Rab6. *Biochimie* **82**, 375-84.
- Darchen, F., Senyshyn, J., Brondyk, W. H., Taatjes, D. J., Holz, R. W., Henry, J. P., Denizot, J. P. and Macara, I. G.** (1995). The GTPase Rab3a is associated with large dense core vesicles in bovine chromaffin cells and rat PC12 cells. *J Cell Sci* **108** ( Pt 4), 1639-49.
- De Blas, G. A., Roggero, C. M., Tomes, C. N. and Mayorga, L. S.** (2005). Dynamics of SNARE assembly and disassembly during sperm acrosomal exocytosis. *PLoS Biol* **3**, e323.
- De Haro, L., Quetglas, S., Iborra, C., Leveque, C. and Seagar, M.** (2003). Calmodulin-dependent regulation of a lipid binding domain in the v-SNARE synaptobrevin and its role in vesicular fusion. *Biol Cell* **95**, 459-64.
- del Pozo, M. A., Alderson, N. B., Kiosses, W. B., Chiang, H. H., Anderson, R. G. and Schwartz, M. A.** (2004). Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science* **303**, 839-42.
- Delouche, B., Pradel, L. A. and Henry, J. P.** (1997). Phosphorylation by protein kinase C of annexin 2 in chromaffin cells stimulated by nicotine. *J Neurochem* **68**, 1720-7.
- Deora, A. B., Kreitzer, G., Jacovina, A. T. and Hajjar, K. A.** (2004). An annexin 2 phosphorylation switch mediates p11-dependent translocation of annexin 2 to the cell surface. *J Biol Chem* **279**, 43411-8.
- Desnos, C., Huet, S. and Darchen, F.** (2007). 'Should I stay or should I go?': myosin V function in organelle trafficking. *Biol Cell* **99**, 411-23.
- 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. et al.** (2003). Rab27A and its effector MyRIP link secretory granules to F-actin and control their motion towards release sites. *J Cell Biol* **163**, 559-70.
- Di Paolo, G. and De Camilli, P.** (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651-7.

- Diakonova, M., Gerke, V., Ernst, J., Liautard, J. P., van der Vusse, G. and Griffiths, G.** (1997). Localization of five annexins in J774 macrophages and on isolated phagosomes. *J Cell Sci* **110** ( Pt 10), 1199-213.
- Diaz-Munoz, M., Hamilton, S. L., Kaetzel, M. A., Hazarika, P. and Dedman, J. R.** (1990). Modulation of Ca<sup>2+</sup> release channel activity from sarcoplasmic reticulum by annexin VI (67-kDa calcimedlin). *J Biol Chem* **265**, 15894-9.
- Donato, R.** (1999). Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta* **1450**, 191-231.
- Donato, R.** (2001). S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* **33**, 637-68.
- Drust, D. S. and Creutz, C. E.** (1988). Aggregation of chromaffin granules by calpactin at micromolar levels of calcium. *Nature* **331**, 88-91.
- Du, G., Altshuler, Y. M., Vitale, N., Huang, P., Chasserot-Golaz, S., Morris, A. J., Bader, M. F. and Frohman, M. A.** (2003). Regulation of phospholipase D1 subcellular cycling through coordination of multiple membrane association motifs. *J Cell Biol* **162**, 305-15.
- Dubois, T., Oudinet, J. P., Russo-Marie, F. and Rothhut, B.** (1995). In vivo and in vitro phosphorylation of annexin II in T cells: potential regulation by annexin V. *Biochem J* **310** ( Pt 1), 243-8.
- Dulubova, I., Khvotchev, M., Liu, S., Huryeva, I., Sudhof, T. C. and Rizo, J.** (2007). Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 2697-702.

## E

- Eberhard, D. A., Karns, L. R., VandenBerg, S. R. and Creutz, C. E.** (2001). Control of the nuclear-cytoplasmic partitioning of annexin II by a nuclear export signal and by p11 binding. *J Cell Sci* **114**, 3155-66.
- 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**, 3030-6.
- Evans, T. C., Jr. and Nelsestuen, G. L.** (1994). Calcium and membrane-binding properties of monomeric and multimeric annexin II. *Biochemistry* **33**, 13231-8.

## F

- Falsey, R. R., Marron, M. T., Gunaherath, G. M., Shirahatti, N., Mahadevan, D., Gunatilaka, A. A. and Whitesell, L.** (2006). Actin microfilament aggregation induced by withaferin A is mediated by annexin II. *Nat Chem Biol* **2**, 33-8.
- Faure, A. V., Migne, C., Devilliers, G. and Ayala-Sanmartin, J.** (2002). Annexin 2 "secretion" accompanying exocytosis of chromaffin cells: possible mechanisms of annexin release. *Exp Cell Res* **276**, 79-89.
- Fiedler, K., Lafont, F., Parton, R. G. and Simons, K.** (1995). Annexin XIIIb: a novel epithelial specific annexin is implicated in vesicular traffic to the apical plasma membrane. *J Cell Biol* **128**, 1043-53.

- Field, K. A., Holowka, D. and Baird, B.** (1995). Fc epsilon RI-mediated recruitment of p53/56lyn to detergent-resistant membrane domains accompanies cellular signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9201-5.
- Filipek, A., Gerke, V., Weber, K. and Kuznicki, J.** (1991). Characterization of the cell-cycle-regulated protein calyculin from Ehrlich ascites tumor cells. Identification of two binding proteins obtained by Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent affinity chromatography. *Eur J Biochem* **195**, 795-800.
- Filipenko, N. R., Kang, H. M. and Waisman, D. M.** (2000). Characterization of the Ca<sup>2+</sup>-binding sites of annexin II tetramer. *J Biol Chem* **275**, 38877-84.
- Filipenko, N. R. and Waisman, D. M.** (2001). The C terminus of annexin II mediates binding to F-actin. *J Biol Chem* **276**, 5310-5.
- Flower, R. J. and Rothwell, N. J.** (1994). Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance. *Trends Pharmacol Sci* **15**, 71-6.
- Foulkes, T., Nassar, M. A., Lane, T., Matthews, E. A., Baker, M. D., Gerke, V., Okuse, K., Dickenson, A. H. and Wood, J. N.** (2006). Deletion of annexin 2 light chain p11 in nociceptors causes deficits in somatosensory coding and pain behavior. *J Neurosci* **26**, 10499-507.
- Fulop, T., Radabaugh, S. and Smith, C.** (2005). Activity-dependent differential transmitter release in mouse adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* **25**, 7324-32.
- Futter, C. E., Felder, S., Schlessinger, J., Ullrich, A. and Hopkins, C. R.** (1993). Annexin I is phosphorylated in the multivesicular body during the processing of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol* **120**, 77-83.

## G

- Garcia-Saez, A. J., Chiantia, S. and Schwille, P.** (2007). Effect of line tension on the lateral organization of lipid membranes. *J Biol Chem* **282**, 33537-44.
- Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., Bader, M. F. and Vitale, N.** (2003). Regulation of exocytosis in adrenal chromaffin cells: focus on ARF and Rho GTPases. *Cell Signal* **15**, 893-9.
- Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., Malacombe, M., Way, M. and Bader, M. F.** (2004). Regulated exocytosis in neuroendocrine cells: a role for subplasmalemmal Cdc42/N-WASP-induced actin filaments. *Mol Biol Cell* **15**, 520-31.
- Gerke, V., Creutz, C. E. and Moss, S. E.** (2005). Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 449-61.
- Gerke, V. and Moss, S. E.** (1997). Annexins and membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta* **1357**, 129-54.
- Gerke, V. and Moss, S. E.** (2002). Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* **82**, 331-71.
- Gerke, V. and Weber, K.** (1985). The regulatory chain in the p36-kd substrate complex of viral tyrosine-specific protein kinases is related in sequence to the S-100 protein of glial cells. *Embo J* **4**, 2917-20.
- Gil, C., Soler-Jover, A., Blasi, J. and Aguilera, J.** (2005). Synaptic proteins and SNARE complexes are localized in lipid rafts from rat brain synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun* **329**, 117-24.
- Girard, C., Tinel, N., Terrenoire, C., Romey, G., Lazdunski, M. and Borsotto, M.** (2002). p11, an annexin II subunit, an auxiliary protein associated with the background K<sup>+</sup> channel, TASK-1. *Embo J* **21**, 4439-48.

- Giraudo, C. G., Eng, W. S., Melia, T. J. and Rothman, J. E.** (2006). A clamping mechanism involved in SNARE-dependent exocytosis. *Science* **313**, 676-80.
- Glenney, J. R., Jr., Tack, B. and Powell, M. A.** (1987). Calpactins: two distinct Ca<sup>++</sup>-regulated phospholipid- and actin-binding proteins isolated from lung and placenta. *J Cell Biol* **104**, 503-11.
- Gokhale, N. A., Abraham, A., Digman, M. A., Gratton, E. and Cho, W.** (2005). Phosphoinositide specificity of and mechanism of lipid domain formation by annexin A2-p11 heterotetramer. *J Biol Chem* **280**, 42831-40.
- Golczak, M., Kicinska, A., Bandorowicz-Pikula, J., Buchet, R., Szewczyk, A. and Pikula, S.** (2001). Acidic pH-induced folding of annexin VI is a prerequisite for its insertion into lipid bilayers and formation of ion channels by the protein molecules. *Faseb J* **15**, 1083-5.
- Golub, T. and Caroni, P.** (2005). PI(4,5)P<sub>2</sub>-dependent microdomain assemblies capture microtubules to promote and control leading edge motility. *J Cell Biol* **169**, 151-65.
- Gomez-Mouton, C., Abad, J. L., Mira, E., Lacalle, R. A., Gallardo, E., Jimenez-Baranda, S., Illa, I., Bernad, A., Manes, S. and Martinez, A. C.** (2001). Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9642-7.
- Gould, K. L., Woodgett, J. R., Isacke, C. M. and Hunter, T.** (1986). The protein-tyrosine kinase substrate p36 is also a substrate for protein kinase C in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol* **6**, 2738-44.
- Grant, N. J., Hepp, R., Krause, W., Aunis, D., Oehme, P. and Langley, K.** (1999). Differential expression of SNAP-25 isoforms and SNAP-23 in the adrenal gland. *J Neurochem* **72**, 363-72.
- 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**, 2424-8.
- Gruenberg, J. and Stenmark, H.** (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 317-23.
- Grzybek, M., Chorzalska, A., Bok, E., Hryniewicz-Jankowska, A., Czogalla, A., Diakowski, W. and Sikorski, A. F.** (2006). Spectrin-phospholipid interactions. Existence of multiple kinds of binding sites? *Chem Phys Lipids* **141**, 133-41.
- Guan, J. L.** (2004). Cell biology. Integrins, rafts, Rac, and Rho. *Science* **303**, 773-4.
- Gulbins, E. and Li, P. L.** (2006). Physiological and pathophysiological aspects of ceramide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **290**, R11-26.
- Gulyas-Kovacs, A., de Wit, H., Milosevic, I., Kochubey, O., Toonen, R., Klingauf, J., Verhage, M. and Sorensen, J. B.** (2007). Munc18-1: sequential interactions with the fusion machinery stimulate vesicle docking and priming. *J Neurosci* **27**, 8676-86.
- Gundelfinger, E. D., Kessels, M. M. and Qualmann, B.** (2003). Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 127-39.

## H

- Han, J. M., Kim, Y., Lee, J. S., Lee, C. S., Lee, B. D., Ohba, M., Kuroki, T., Suh, P. G. and Ryu, S. H.** (2002). Localization of phospholipase D1 to caveolin-enriched membrane via palmitoylation: implications for epidermal growth factor signaling. *Mol Biol Cell* **13**, 3976-88.
- Hancock, J. F.** (2003). Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 373-84.

- Hancock, J. F.** (2006). Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 456-62.
- Hancock, J. F. and Prior, I. A.** (2005). Electron microscopic imaging of Ras signaling domains. *Methods* **37**, 165-72.
- Hansen, M. D., Ehrlich, J. S. and Nelson, W. J.** (2002). Molecular mechanism for orienting membrane and actin dynamics to nascent cell-cell contacts in epithelial cells. *J Biol Chem* **277**, 45371-6.
- Hanson, P. I., Roth, R., Morisaki, H., Jahn, R. and Heuser, J. E.** (1997). Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell* **90**, 523-35.
- Hanzal-Bayer, M. F. and Hancock, J. F.** (2007). Lipid rafts and membrane traffic. *FEBS Lett* **581**, 2098-104.
- Harata, N. C., Aravanis, A. M. and Tsien, R. W.** (2006). Kiss-and-run and full-collapse fusion as modes of exo-endocytosis in neurosecretion. *J Neurochem* **97**, 1546-70.
- Harder, T., Kellner, R., Parton, R. G. and Gruenberg, J.** (1997). Specific release of membrane-bound annexin II and cortical cytoskeletal elements by sequestration of membrane cholesterol. *Mol Biol Cell* **8**, 533-45.
- Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P. and Simons, K.** (1998). Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* **141**, 929-42.
- Hatsuzawa, K., Lang, T., Fasshauer, D., Bruns, D. and Jahn, R.** (2003). The R-SNARE motif of tomosyn forms SNARE core complexes with syntaxin 1 and SNAP-25 and down-regulates exocytosis. *J Biol Chem* **278**, 31159-66.
- Hayes, M. J., Merrifield, C. J., Shao, D., Ayala-Sanmartin, J., Schorey, C. D., Levine, T. P., Proust, J., Curran, J., Bailly, M. and Moss, S. E.** (2004a). Annexin 2 binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on endocytic vesicles is regulated by the stress response pathway. *J Biol Chem* **279**, 14157-64.
- Hayes, M. J., Rescher, U., Gerke, V. and Moss, S. E.** (2004b). Annexin-actin interactions. *Traffic* **5**, 571-6.
- Hayes, M. J., Shao, D., Bailly, M. and Moss, S. E.** (2006). Regulation of actin dynamics by annexin 2. *Embo J* **25**, 1816-26.
- Head, B. P., Patel, H. H., Roth, D. M., Murray, F., Swaney, J. S., Niesman, I. R., Farquhar, M. G. and Insel, P. A.** (2006). Microtubules and actin microfilaments regulate lipid raft/caveolae localization of adenylyl cyclase signaling components. *J Biol Chem* **281**, 26391-9.
- Heerklotz, H., Szadkowska, H., Anderson, T. and Seelig, J.** (2003). The sensitivity of lipid domains to small perturbations demonstrated by the effect of Triton. *J Mol Biol* **329**, 793-9.
- Hering, H., Lin, C. C. and Sheng, M.** (2003). Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J Neurosci* **23**, 3262-71.
- Hoekstra, D., Maier, O., van der Wouden, J. M., Slimane, T. A. and van, I. S. C.** (2003). Membrane dynamics and cell polarity: the role of sphingolipids. *J Lipid Res* **44**, 869-77.
- Hubaishy, I., Jones, P. G., Bjorge, J., Bellagamba, C., Fitzpatrick, S., Fujita, D. J. and Waisman, D. M.** (1995). Modulation of annexin II tetramer by tyrosine phosphorylation. *Biochemistry* **34**, 14527-34.
- Huber, R., Berendes, R., Burger, A., Schneider, M., Karshikov, A., Luecke, H., Romisch, J. and Paques, E.** (1992). Crystal and molecular structure of human annexin V after refinement. Implications for structure, membrane binding and ion channel formation of the annexin family of proteins. *J Mol Biol* **223**, 683-704.

**Huber, R., Romisch, J. and Paques, E. P.** (1990). The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. *Embo J* **9**, 3867-74.

**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**, 40581-9.

**Humeau, Y., Doussau, F., Grant, N. J. and Poulain, B.** (2000). How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. *Biochimie* **82**, 427-46.

## I

**Ikebuchi, N. W. and Waisman, D. M.** (1990). Calcium-dependent regulation of actin filament bundling by lipocortin-85. *J Biol Chem* **265**, 3392-400.

## J

**Jackson, M. B. and Chapman, E. R.** (2006). Fusion pores and fusion machines in Ca<sup>2+</sup>-triggered exocytosis. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **35**, 135-60.

**Jacobson, K., Mouritsen, O. G. and Anderson, R. G.** (2007). Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nat Cell Biol* **9**, 7-14.

**Jacobson, K., Sheets, E. D. and Simson, R.** (1995). Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science* **268**, 1441-2.

**Johnson, R. G., Jr.** (1987). Proton pumps and chemiosmotic coupling as a generalized mechanism for neurotransmitter and hormone transport. *Ann N Y Acad Sci* **493**, 162-77.

**Johnsson, N., Marriott, G. and Weber, K.** (1988). p36, the major cytoplasmic substrate of src tyrosine protein kinase, binds to its p11 regulatory subunit via a short amino-terminal amphiphatic helix. *Embo J* **7**, 2435-42.

**Johnsson, N., Nguyen Van, P., Soling, H. D. and Weber, K.** (1986). Functionally distinct serine phosphorylation sites of p36, the cellular substrate of retroviral protein kinase; differential inhibition of reassociation with p11. *Embo J* **5**, 3455-60.

**Johnstone, S. A., Hubaishy, I. and Waisman, D. M.** (1992). Phosphorylation of annexin II tetramer by protein kinase C inhibits aggregation of lipid vesicles by the protein. *J Biol Chem* **267**, 25976-81.

**Jones, P. G., Moore, G. J. and Waisman, D. M.** (1992). A nonapeptide to the putative F-actin binding site of annexin-II tetramer inhibits its calcium-dependent activation of actin filament bundling. *J Biol Chem* **267**, 13993-7.

**Jost, M., Thiel, C., Weber, K. and Gerke, V.** (1992). Mapping of three unique Ca<sup>2+</sup>-binding sites in human annexin II. *Eur J Biochem* **207**, 923-30.

**Jost, M., Weber, K. and Gerke, V.** (1994). Annexin II contains two types of Ca<sup>2+</sup>-binding sites. *Biochem J* **298 Pt 3**, 553-9.

## K

**Kamal, A., Ying, Y. and Anderson, R. G.** (1998). Annexin VI-mediated loss of spectrin during coated pit budding is coupled to delivery of LDL to lysosomes. *J Cell Biol* **142**, 937-47.

- Karlin, A.** (2002). Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci* **3**, 102-14.
- Kassam, G., Le, B. H., Choi, K. S., Kang, H. M., Fitzpatrick, S. L., Louie, P. and Waisman, D. M.** (1998). The p11 subunit of the annexin II tetramer plays a key role in the stimulation of t-PA-dependent plasminogen activation. *Biochemistry* **37**, 16958-66.
- Kim, J. and Hajjar, K. A.** (2002). Annexin II: a plasminogen-plasminogen activator co-receptor. *Front Biosci* **7**, d341-8.
- Kim, T., Gondre-Lewis, M. C., Arnaoutova, I. and Loh, Y. P.** (2006). Dense-core secretory granule biogenesis. *Physiology (Bethesda)* **21**, 124-33.
- Kim, T., Tao-Cheng, J. H., Eiden, L. E. and Loh, Y. P.** (2001). Chromogranin A, an "on/off" switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. *Cell* **106**, 499-509.
- Kim, Y., Han, J. M., Han, B. R., Lee, K. A., Kim, J. H., Lee, B. D., Jang, I. H., Suh, P. G. and Ryu, S. H.** (2000). Phospholipase D1 is phosphorylated and activated by protein kinase C in caveolin-enriched microdomains within the plasma membrane. *J Biol Chem* **275**, 13621-7.
- Knecht, V. and Grubmuller, H.** (2003). Mechanical coupling via the membrane fusion SNARE protein syntaxin 1A: a molecular dynamics study. *Biophys J* **84**, 1527-47.
- Knop, M., Aareskjold, E., Bode, G. and Gerke, V.** (2004). Rab3D and annexin A2 play a role in regulated secretion of vWF, but not tPA, from endothelial cells. *Embo J* **23**, 2982-92.
- Kohler, G., Hering, U., Zschornig, O. and Arnold, K.** (1997). Annexin V interaction with phosphatidylserine-containing vesicles at low and neutral pH. *Biochemistry* **36**, 8189-94.
- Konig, J., Prenen, J., Nilius, B. and Gerke, V.** (1998). The annexin II-p11 complex is involved in regulated exocytosis in bovine pulmonary artery endothelial cells. *J Biol Chem* **273**, 19679-84.
- Kreitzer, G., Marmorstein, A., Okamoto, P., Vallee, R. and Rodriguez-Boulan, E.** (2000). Kinesin and dynamin are required for post-Golgi transport of a plasma-membrane protein. *Nat Cell Biol* **2**, 125-7.
- Kusumawati, A., Cazevielle, C., Porte, F., Bettache, S., Liautard, J. P. and Sri Widada, J.** (2000). Early events and implication of F-actin and annexin I associated structures in the phagocytic uptake of *Brucella suis* by the J-774A.1 murine cell line and human monocytes. *Microb Pathog* **28**, 343-52.
- Kusumawati, A., Liautard, J. P. and Sri Widada, J.** (2001). Implication of annexin 1 in phagocytosis: effects of n-terminal domain deletions and point mutations of the phosphorylation site Ser-27. *Cell Biol Int* **25**, 809-13.
- Kusumi, A., Ike, H., Nakada, C., Murase, K. and Fujiwara, T.** (2005). Single-molecule tracking of membrane molecules: plasma membrane compartmentalization and dynamic assembly of raft-philic signaling molecules. *Semin Immunol* **17**, 3-21.
- Kusumi, A., Sako, Y. and Yamamoto, M.** (1993). Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys J* **65**, 2021-40.
- Kwon, M., MacLeod, T. J., Zhang, Y. and Waisman, D. M.** (2005). S100A10, annexin A2, and annexin a2 heterotetramer as candidate plasminogen receptors. *Front Biosci* **10**, 300-25.

## L

- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lafont, F., Abrami, L. and van der Goot, F. G.** (2004). Bacterial subversion of lipid rafts. *Curr Opin Microbiol* **7**, 4-10.

**Lafont, F., Lecat, S., Verkade, P. and Simons, K.** (1998). Annexin XIIIb associates with lipid microdomains to function in apical delivery. *J Cell Biol* **142**, 1413-27.

**Lafont, F., Tran Van Nhieu, G., Hanada, K., Sansonetti, P. and van der Goot, F. G.** (2002). Initial steps of Shigella infection depend on the cholesterol/sphingolipid raft-mediated CD44-IpaB interaction. *Embo J* **21**, 4449-57.

**Lafont, F. and van der Goot, F. G.** (2005). Bacterial invasion via lipid rafts. *Cell Microbiol* **7**, 613-20.

**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**, 3734-8.

**Lamaze, C., Dujeancourt, A., Baba, T., Lo, C. G., Benmerah, A. and Dautry-Varsat, A.** (2001). Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell* **7**, 661-71.

**Lambert, O., Gerke, V., Bader, M. F., Porte, F. and Brisson, A.** (1997). Structural analysis of junctions formed between lipid membranes and several annexins by cryo-electron microscopy. *J Mol Biol* **272**, 42-55.

**Lang, T.** (2007). SNARE proteins and membrane rafts. *J Physiol*.

**Lang, T., Bruns, D., Wenzel, D., Riedel, D., Holroyd, P., Thiele, C. and Jahn, R.** (2001). SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *Embo J* **20**, 2202-13.

**Lang, T., Margittai, M., Holzler, H. and Jahn, R.** (2002). SNAREs in native plasma membranes are active and readily form core complexes with endogenous and exogenous SNAREs. *J Cell Biol* **158**, 751-60.

**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**, 2863-77.

**Lauer, S., VanWye, J., Harrison, T., McManus, H., Samuel, B. U., Hiller, N. L., Mohandas, N. and Haldar, K.** (2000). Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection. *Embo J* **19**, 3556-64.

**Lawrence, J. C., Saslowsky, D. E., Edwardson, J. M. and Henderson, R. M.** (2003). Real-time analysis of the effects of cholesterol on lipid raft behavior using atomic force microscopy. *Biophys J* **84**, 1827-32.

**Lecat, S. and Lafont, F.** (1999). Annexins and their interacting proteins in membrane traffic. *Protoplasma* **207**, 133-140.

**Lenne, P. F., Wawrezynieck, L., Conchonaud, F., Wurtz, O., Boned, A., Guo, X. J., Rigneault, H., He, H. T. and Marguet, D.** (2006). Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork. *Embo J* **25**, 3245-56.

**Lillemeier, B. F., Pfeiffer, J. R., Surviladze, Z., Wilson, B. S. and Davis, M. M.** (2006). Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 18992-7.

**Lin, W. C., Blanchette, C. D., Ratto, T. V. and Longo, M. L.** (2006). Lipid asymmetry in DLPC/DSPC-supported lipid bilayers: a combined AFM and fluorescence microscopy study. *Biophys J* **90**, 228-37.

**Liu, L.** (1999). Calcium-dependent self-association of annexin II: a possible implication in exocytosis. *Cell Signal* **11**, 317-24.

**Lopez, I., Giner, D., Ruiz-Nuno, A., Fuentealba, J., Viniegra, S., Garcia, A. G., Davletov, B. and Gutierrez, L. M.** (2007). Tight coupling of the t-SNARE and calcium channel microdomains in adrenomedullary slices and not in cultured chromaffin cells. *Cell Calcium* **41**, 547-58.

# M

- Madore, N., Smith, K. L., Graham, C. H., Jen, A., Brady, K., Hall, S. and Morris, R.** (1999). Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface. *Embo J* **18**, 6917-26.
- Maguy, A., Hebert, T. E. and Nattel, S.** (2006). Involvement of lipid rafts and caveolae in cardiac ion channel function. *Cardiovasc Res* **69**, 798-807.
- Mailliard, W. S., Haigler, H. T. and Schlaepfer, D. D.** (1996). Calcium-dependent binding of S100C to the N-terminal domain of annexin I. *J Biol Chem* **271**, 719-25.
- Malacombe, M., Bader, M. F. and Gasman, S.** (2006). Exocytosis in neuroendocrine cells: new tasks for actin. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 1175-83.
- Manes, S., del Real, G. and Martinez, A. C.** (2003). Pathogens: raft hijackers. *Nat Rev Immunol* **3**, 557-68.
- Mansfield, P. J., Hinkovska-Galcheva, V., Borofsky, M. S., Shayman, J. A. and Boxer, L. A.** (2005). Phagocytic signaling molecules in lipid rafts of COS-1 cells transfected with Fc $\gamma$ RIIA. *Biochem Biophys Res Commun* **331**, 132-8.
- Martelli, A. M., Baldini, G., Tabellini, G., Koticha, D., Bareggi, R. and Baldini, G.** (2000). Rab3A and Rab3D control the total granule number and the fraction of granules docked at the plasma membrane in PC12 cells. *Traffic* **1**, 976-86.
- Martens, J. R., O'Connell, K. and Tamkun, M.** (2004). Targeting of ion channels to membrane microdomains: localization of KV channels to lipid rafts. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 16-21.
- Martin-Belmonte, F., Gassama, A., Datta, A., Yu, W., Rescher, U., Gerke, V. and Mostov, K.** (2007). PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42. *Cell* **128**, 383-97.
- Mayran, N., Parton, R. G. and Gruenberg, J.** (2003). Annexin II regulates multivesicular endosome biogenesis in the degradation pathway of animal cells. *Embo J* **22**, 3242-53.
- McCudden, C. R., Hains, M. D., Kimple, R. J., Siderovski, D. P. and Willard, F. S.** (2005). G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci* **62**, 551-77.
- Menke, M., Gerke, V. and Steinem, C.** (2005). Phosphatidylserine membrane domain clustering induced by annexin A2/S100A10 heterotetramer. *Biochemistry* **44**, 15296-303.
- Menke, M., Ross, M., Gerke, V. and Steinem, C.** (2004). The molecular arrangement of membrane-bound annexin A2-S100A10 tetramer as revealed by scanning force microscopy. *Chembiochem* **5**, 1003-6.
- 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**, 1136-41.
- Meyer, M. Z., Deliot, N., Chasserot-Golaz, S., Premont, R. T., Bader, M. F. and Vitale, N.** (2006). Regulation of neuroendocrine exocytosis by the ARF6 GTPase-activating protein GIT1. *J Biol Chem* **281**, 7919-26.
- Mishra, L. C., Singh, B. B. and Dagenais, S.** (2000). Scientific basis for the therapeutic use of *Withania somnifera* (ashwagandha): a review. *Altern Med Rev* **5**, 334-46.
- Miura, Y., Hanada, K. and Jones, T. L.** (2001). G(s) signaling is intact after disruption of lipid rafts. *Biochemistry* **40**, 15418-23.
- Monastyrskaya, K., Babiychuk, E. B., Hostettler, A., Rescher, U. and Draeger, A.** (2006). Annexins as intracellular calcium sensors. *Cell Calcium*.
- Monastyrskaya, K., Tschumi, F., Babiychuk, E. B., Stroka, D. and Draeger, A.** (2007). Annexins sense changes in intracellular pH during hypoxia. *Biochem J*.

- Montecucco, C., Schiavo, G. and Pantano, S.** (2005). SNARE complexes and neuroexocytosis: how many, how close? *Trends Biochem Sci* **30**, 367-72.
- Moore, P. B., Kraus-Friedmann, N. and Dedman, J. R.** (1984). Unique calcium-dependent hydrophobic binding proteins: possible independent mediators of intracellular calcium distinct from calmodulin. *J Cell Sci* **72**, 121-33.
- Morgan, A. and Burgoyne, R. D.** (1997). Common mechanisms for regulated exocytosis in the chromaffin cell and the synapse. *Semin Cell Dev Biol* **8**, 141-9.
- Moss, S. E. and Morgan, R. O.** (2004). The annexins. *Genome Biol* **5**, 219.
- Munro, S.** (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* **115**, 377-88.

## N

- Nakata, T., Sobue, K. and Hirokawa, N.** (1990). Conformational change and localization of calpactin I complex involved in exocytosis as revealed by quick-freeze, deep-etch electron microscopy and immunocytochemistry. *J Cell Biol* **110**, 13-25.
- 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**, 733-42.
- 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**, 27450-7.
- Niedergang, F. and Chavrier, P.** (2004). Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 422-8.
- Niki, I., Okazaki, K., Iino, S., Kobayashi, S. and Hidaka, H.** (1997). Calcyclin, a calcium-binding protein, which regulates insulin secretion from the permeabilized pancreatic beta-cell. *Adv Exp Med Biol* **426**, 85-9.
- Norman, J. C., Price, L. S., Ridley, A. J., Hall, A. and Koffer, A.** (1994). Actin filament organization in activated mast cells is regulated by heterotrimeric and small GTP-binding proteins. *J Cell Biol* **126**, 1005-15.

## O

- Ohara-Imaizumi, M., Nishiwaki, C., Kikuta, T., Kumakura, K., Nakamichi, Y. and Nagamatsu, S.** (2004). Site of docking and fusion of insulin secretory granules in live MIN6 beta cells analyzed by TAT-conjugated anti-syntaxin 1 antibody and total internal reflection fluorescence microscopy. *J Biol Chem* **279**, 8403-8.
- Oheim, M. and Stuhmer, W.** (2000). Tracking chromaffin granules on their way through the actin cortex. *Eur Biophys J* **29**, 67-89.
- Okuse, K., Malik-Hall, M., Baker, M. D., Poon, W. Y., Kong, H., Chao, M. V. and Wood, J. N.** (2002). Annexin II light chain regulates sensory neuron-specific sodium channel expression. *Nature* **417**, 653-6.
- Oliferenko, S., Paiha, K., Harder, T., Gerke, V., Schwarzler, C., Schwarz, H., Beug, H., Gunthert, U. and Huber, L. A.** (1999). Analysis of CD44-containing lipid rafts: Recruitment of annexin II and stabilization by the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* **146**, 843-54.

## P

- Parmryd, I., Adler, J., Patel, R. and Magee, A. I.** (2003). Imaging metabolism of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in T-cell GM1-enriched domains containing Ras proteins. *Exp Cell Res* **285**, 27-38.
- 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**, 1085-96.
- Parton, R. G., Hanzal-Bayer, M. and Hancock, J. F.** (2006). Biogenesis of caveolae: a structural model for caveolin-induced domain formation. *J Cell Sci* **119**, 787-96.
- Parton, R. G. and Richards, A. A.** (2003). Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic* **4**, 724-38.
- Pediconi, M. F., Gallegos, C. E., De Los Santos, E. B. and Barrantes, F. J.** (2004). Metabolic cholesterol depletion hinders cell-surface trafficking of the nicotinic acetylcholine receptor. *Neuroscience* **128**, 239-49.
- 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.
- Peres, C., Yart, A., Perret, B., Salles, J. P. and Raynal, P.** (2003). Modulation of phosphoinositide 3-kinase activation by cholesterol level suggests a novel positive role for lipid rafts in lysophosphatidic acid signalling. *FEBS Lett* **534**, 164-8.
- Perlman, R. L. and Chalfie, M.** (1977). Catecholamine release from the adrenal medulla. *Clin Endocrinol Metab* **6**, 551-76.
- Perretti, M. and Gavins, F. N.** (2003). Annexin 1: an endogenous anti-inflammatory protein. *News Physiol Sci* **18**, 60-4.
- Perrin, D. and Aunis, D.** (1985). Reorganization of alpha-fodrin induced by stimulation in secretory cells. *Nature* **315**, 589-92.
- Perrin, D., Langley, O. K. and Aunis, D.** (1987). Anti-alpha-fodrin inhibits secretion from permeabilized chromaffin cells. *Nature* **326**, 498-501.
- Pike, L. J.** (2003). Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res* **44**, 655-67.
- Pike, L. J.** (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res* **47**, 1597-8.
- Pittis, M. G., Muzzolin, L., Giulianini, P. G. and Garcia, R. C.** (2003). Mycobacteria-containing phagosomes associate less annexins I, VI, VII and XI, but not II, concomitantly with a diminished phagolysosomal fusion. *Eur J Cell Biol* **82**, 9-17.
- 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**, 102-8.
- Pombo, I., Rivera, J. and Blank, U.** (2003). Munc18-2/syntaxin3 complexes are spatially separated from syntaxin3-containing SNARE complexes. *FEBS Lett* **550**, 144-8.
- Poon, W. Y., Malik-Hall, M., Wood, J. N. and Okuse, K.** (2004). Identification of binding domains in the sodium channel Na(V)1.8 intracellular N-terminal region and annexin II light chain p11. *FEBS Lett* **558**, 114-8.
- Powell, M. A. and Glenney, J. R.** (1987). Regulation of calpactin I phospholipid binding by calpactin I light-chain binding and phosphorylation by p60v-src. *Biochem J* **247**, 321-8.
- Prag, S., Parsons, M., Keppler, M. D., Ameer-Beg, S. M., Barber, P., Hunt, J., Beavil, A. J., Calvert, R., Arpin, M., Vojnovic, B. et al.** (2007). Activated Ezrin Promotes Cell Migration through Recruitment of the GEF Dbl to Lipid Rafts and Preferential Downstream Activation of Cdc42. *Mol Biol Cell*.

**Predescu, S. A., Predescu, D. N., Shimizu, K., Klein, I. K. and Malik, A. B.** (2005). Cholesterol-dependent syntaxin-4 and SNAP-23 clustering regulates caveolar fusion with the endothelial plasma membrane. *J Biol Chem* **280**, 37130-8.

**Prior, I. A., Muncke, C., Parton, R. G. and Hancock, J. F.** (2003). Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J Cell Biol* **160**, 165-70.

**Puri, N. and Roche, P. A.** (2006). Ternary SNARE complexes are enriched in lipid rafts during mast cell exocytosis. *Traffic* **7**, 1482-94.

## Q

**Quetglas, S., Leveque, C., Miquelis, R., Sato, K. and Seagar, M.** (2000). Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of synaptic SNARE complex assembly via a calmodulin- and phospholipid-binding domain of synaptobrevin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9695-700.

## R

**Rajendran, L., Masilamani, M., Solomon, S., Tikkanen, R., Stuermer, C. A., Plattner, H. and Illges, H.** (2003). Asymmetric localization of flotillins/reggies in preassembled platforms confers inherent polarity to hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8241-6.

**Rajendran, L. and Simons, K.** (2005). Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci* **118**, 1099-102.

**Rand, J. H.** (2000). Antiphospholipid antibody-mediated disruption of the annexin-V antithrombotic shield: a thrombogenic mechanism for the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun* **15**, 107-11.

**Raynal, P. and Pollard, H. B.** (1994). Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* **1197**, 63-93.

**Regnoul, F., Sagot, I., Delouche, B., Devilliers, G., Cartaud, J., Henry, J. P. and Pradel, L. A.** (1995). "In vitro" phosphorylation of annexin 2 heterotetramer by protein kinase C. Comparative properties of the unphosphorylated and phosphorylated annexin 2 on the aggregation and fusion of chromaffin granule membranes. *J Biol Chem* **270**, 27143-50.

**Rescher, U. and Gerke, V.** (2004). Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci* **117**, 2631-9.

**Rescher, U. and Gerke, V.** (2007). S100A10/p11: family, friends and functions. *Pflugers Arch*.

**Rescher, U., Ruhe, D., Ludwig, C., Zobiack, N. and Gerke, V.** (2004). Annexin 2 is a phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding protein recruited to actin assembly sites at cellular membranes. *J Cell Sci* **117**, 3473-80.

**Rescher, U., Zobiack, N. and Gerke, V.** (2000). Intact Ca(2+)-binding sites are required for targeting of annexin 1 to endosomal membranes in living HeLa cells. *J Cell Sci* **113** ( Pt 22), 3931-8.

**Rety, S., Sopkova, J., Renouard, M., Osterloh, D., Gerke, V., Tabaries, S., Russo-Marie, F. and Lewit-Bentley, A.** (1999). The crystal structure of a complex of p11 with the annexin II N-terminal peptide. *Nat Struct Biol* **6**, 89-95.

**Rintala-Dempsey, A. C., Santamaria-Kisiel, L., Liao, Y., Lajoie, G. and Shaw, G. S.** (2006). Insights into S100 target specificity examined by a new interaction between S100A11 and annexin A2. *Biochemistry* **45**, 14695-705.

- Robinson, I. M., Finnegan, J. M., Monck, J. R., Wightman, R. M. and Fernandez, J. M.** (1995). Colocalization of calcium entry and exocytotic release sites in adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 2474-8.
- Ross, M., Gerke, V. and Steinem, C.** (2003). Membrane composition affects the reversibility of annexin A2t binding to solid supported membranes: a QCM study. *Biochemistry* **42**, 3131-41.
- Roy, S., Luetterforst, R., Harding, A., Apolloni, A., Etheridge, M., Stang, E., Rolls, B., Hancock, J. F. and Parton, R. G.** (1999). Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat Cell Biol* **1**, 98-105.
- 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**, 1339-48.
- 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**, 1353-65.
- Rukmini, R., Rawat, S. S., Biswas, S. C. and Chattopadhyay, A.** (2001). Cholesterol organization in membranes at low concentrations: effects of curvature stress and membrane thickness. *Biophys J* **81**, 2122-34.

## S

- Sabharanjak, S., Sharma, P., Parton, R. G. and Mayor, S.** (2002). GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytotic pathway. *Dev Cell* **2**, 411-23.
- Sacre, S. M. and Moss, S. E.** (2002). Intracellular localization of endothelial cell annexins is differentially regulated by oxidative stress. *Exp Cell Res* **274**, 254-63.
- Sagot, I., Regnouf, F., Henry, J. P. and Pradel, L. A.** (1997). Translocation of cytosolic annexin 2 to a Triton-insoluble membrane subdomain upon nicotine stimulation of chromaffin cultured cells. *FEBS Lett* **410**, 229-34.
- Salaun, C., James, D. J. and Chamberlain, L. H.** (2004a). Lipid rafts and the regulation of exocytosis. *Traffic* **5**, 255-64.
- Salaun, C., James, D. J., Greaves, J. and Chamberlain, L. H.** (2004b). Plasma membrane targeting of exocytic SNARE proteins. *Biochim Biophys Acta* **1693**, 81-9.
- Sampo, B., Kaech, S., Kunz, S. and Banker, G.** (2003). Two distinct mechanisms target membrane proteins to the axonal surface. *Neuron* **37**, 611-24.
- Sankaranarayanan, S., Atluri, P. P. and Ryan, T. A.** (2003). Actin has a molecular scaffolding, not propulsive, role in presynaptic function. *Nat Neurosci* **6**, 127-35.
- Santamaria-Kisiel, L., Rintala-Dempsey, A. C. and Shaw, G. S.** (2006). Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *Biochem J* **396**, 201-14.
- Sarafian, T., Aunis, D. and Bader, M. F.** (1987). Loss of proteins from digitonin-permeabilized adrenal chromaffin cells essential for exocytosis. *J Biol Chem* **262**, 16671-6.
- Sarafian, T., Pradel, L. A., Henry, J. P., Aunis, D. and Bader, M. F.** (1991). The participation of annexin II (calpactin I) in calcium-evoked exocytosis requires protein kinase C. *J Cell Biol* **114**, 1135-47.
- Schiavo, G., Rossetto, O., Benfenati, F., Poulain, B. and Montecucco, C.** (1994). Tetanus and botulinum neurotoxins are zinc proteases specific for components of the neuroexocytosis apparatus. *Ann N Y Acad Sci* **710**, 65-75.
- Schoch, S. and Gundelfinger, E. D.** (2006). Molecular organization of the presynaptic active zone. *Cell Tissue Res* **326**, 379-91.

**Schroeder, R., London, E. and Brown, D.** (1994). Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12130-4.

**Schuck, S., Honsho, M., Ekroos, K., Shevchenko, A. and Simons, K.** (2003). Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5795-800.

**Schuck, S. and Simons, K.** (2004). Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. *J Cell Sci* **117**, 5955-64.

**Senda, T., Okabe, T., Matsuda, M. and Fujita, H.** (1994). Quick-freeze, deep-etch visualization of exocytosis in anterior pituitary secretory cells: localization and possible roles of actin and annexin II. *Cell Tissue Res* **277**, 51-60.

**Shaw, J. E., Epand, R. F., Epand, R. M., Li, Z., Bittman, R. and Yip, C. M.** (2006). Correlated fluorescence-atomic force microscopy of membrane domains: structure of fluorescence probes determines lipid localization. *Biophys J* **90**, 2170-8.

**Shen, J., Tareste, D. C., Paumet, F., Rothman, J. E. and Melia, T. J.** (2007). Selective activation of cognate SNAREpins by Sec1/Munc18 proteins. *Cell* **128**, 183-95.

**Sieber, J. J., Willig, K. I., Heintzmann, R., Hell, S. W. and Lang, T.** (2006). The SNARE motif is essential for the formation of syntaxin clusters in the plasma membrane. *Biophys J* **90**, 2843-51.

**Silvius, J. R.** (2003). Fluorescence energy transfer reveals microdomain formation at physiological temperatures in lipid mixtures modeling the outer leaflet of the plasma membrane. *Biophys J* **85**, 1034-45.

**Simons, K. and Ikonen, E.** (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-72.

**Simons, K. and Toomre, D.** (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31-9.

**Simons, K. and Vaz, W. L.** (2004). Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **33**, 269-95.

**Simson, R., Sheets, E. D. and Jacobson, K.** (1995). Detection of temporary lateral confinement of membrane proteins using single-particle tracking analysis. *Biophys J* **69**, 989-93.

**Singer, S. J. and Nicolson, G. L.** (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-31.

**Singh, T. K., Abonyo, B., Narasaraju, T. A. and Liu, L.** (2004). Reorganization of cytoskeleton during surfactant secretion in lung type II cells: a role of annexin II. *Cell Signal* **16**, 63-70.

**Sjogren, B., Hamblin, M. W. and Svenningsson, P.** (2006). Cholesterol depletion reduces serotonin binding and signaling via human 5-HT(7(a)) receptors. *Eur J Pharmacol* **552**, 1-10.

**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**, 1495-502.

**Sopkova-de Oliveira Santos, J., Oling, F. K., Rety, S., Brisson, A., Smith, J. C. and Lewit-Bentley, A.** (2000). S100 protein-annexin interactions: a model of the (Anx2-p11)(2) heterotetramer complex. *Biochim Biophys Acta* **1498**, 181-91.

**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.

**Steyer, J. A. and Almers, W.** (1999). Tracking single secretory granules in live chromaffin cells by evanescent-field fluorescence microscopy. *Biophys J* **76**, 2262-71.

**Steyer, J. A., Horstmann, H. and Almers, W.** (1997). Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells. *Nature* **388**, 474-8.

**Stojilkovic, S. S.** (2005). Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytosis and SNARE function. *Trends Endocrinol Metab* **16**, 81-3.

**Svenningsson, P., Chergui, K., Rachleff, I., Flajolet, M., Zhang, X., El Yacoubi, M., Vaugeois, J. M., Nomikos, G. G. and Greengard, P.** (2006). Alterations in 5-HT1B receptor function by p11 in depression-like states. *Science* **311**, 77-80.

**Svenningsson, P. and Greengard, P.** (2007). p11 (S100A10)--an inducible adaptor protein that modulates neuronal functions. *Curr Opin Pharmacol* **7**, 27-32.

## T

**Tagaya, M., Genma, T., Yamamoto, A., Kozaki, S. and Mizushima, S.** (1996). SNAP-25 is present on chromaffin granules and acts as a SNAP receptor. *FEBS Lett* **394**, 83-6.

**Tagaya, M., Toyonaga, S., Takahashi, M., Yamamoto, A., Fujiwara, T., Akagawa, K., Moriyama, Y. and Mizushima, S.** (1995). Syntaxin 1 (HPC-1) is associated with chromaffin granules. *J Biol Chem* **270**, 15930-3.

**Taverna, E., Saba, E., Rowe, J., Francolini, M., Clementi, F. and Rosa, P.** (2004). Role of lipid microdomains in P/Q-type calcium channel (Cav2.1) clustering and function in presynaptic membranes. *J Biol Chem* **279**, 5127-34.

**Teng, F. Y., Wang, Y. and Tang, B. L.** (2001). The syntaxins. *Genome Biol* **2**, REVIEWS3012.

**Tokumitsu, H., Mizutani, A., Minami, H., Kobayashi, R. and Hidaka, H.** (1992). A calyculin-associated protein is a newly identified member of the Ca<sup>2+</sup>/phospholipid-binding proteins, annexin family. *J Biol Chem* **267**, 8919-24.

**Tomas, A. and Moss, S. E.** (2003). Calcium- and cell cycle-dependent association of annexin 11 with the nuclear envelope. *J Biol Chem* **278**, 20210-6.

**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**, 3725-37.

**Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4.

**Trifaro, J., Rose, S. D., Lejen, T. and Elzagallaai, A.** (2000). Two pathways control chromaffin cell cortical F-actin dynamics during exocytosis. *Biochimie* **82**, 339-52.

**Trifaro, J. M.** (1999). Scinderin and cortical F-actin are components of the secretory machinery. *Can J Physiol Pharmacol* **77**, 660-71.

**Trifaro, J. M.** (2002). Molecular biology of the chromaffin cell. *Ann N Y Acad Sci* **971**, 11-8.

**Tsai, S. J.** (2007). The P11, tPA/plasminogen system and brain-derived neurotrophic factor: Implications for the pathogenesis of major depression and the therapeutic mechanism of antidepressants. *Med Hypotheses* **68**, 180-3.

**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**, 2196-203.

**Tsuboi, T., Ravier, M. A., Xie, H., Ewart, M. A., Gould, G. W., Baldwin, S. A. and Rutter, G. A.** (2005). Mammalian exocyst complex is required for the docking step of insulin vesicle exocytosis. *J Biol Chem* **280**, 25565-70.

**Tzima, E., Trotter, P. J., Orchard, M. A. and Walker, J. H.** (2000). Annexin V relocates to the platelet cytoskeleton upon activation and binds to a specific isoform of actin. *Eur J Biochem* **267**, 4720-30.

## U

**Uchiyama, Y., Maxson, M. M., Sawada, T., Nakano, A. and Ewing, A. G.** (2007). Phospholipid mediated plasticity in exocytosis observed in PC12 cells. *Brain Res* **1151**, 46-54.

**Uittenbogaard, A., Everson, W. V., Matveev, S. V. and Smart, E. J.** (2002). Cholesteryl ester is transported from caveolae to internal membranes as part of a caveolin-annexin II lipid-protein complex. *J Biol Chem* **277**, 4925-31.

## V

**Valentijn, J. A., Valentijn, K., Pastore, L. M. and Jamieson, J. D.** (2000). Actin coating of secretory granules during regulated exocytosis correlates with the release of rab3D. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1091-5.

**van de Graaf, S. F., Hoenderop, J. G., Gkika, D., Lamers, D., Prenen, J., Rescher, U., Gerke, V., Staub, O., Nilius, B. and Bindels, R. J.** (2003). Functional expression of the epithelial Ca(2+) channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex. *Embo J* **22**, 1478-87.

**van der Goot, F. G., Tran van Nhieu, G., Allaoui, A., Sansonetti, P. and Lafont, F.** (2004). Rafts can trigger contact-mediated secretion of bacterial effectors via a lipid-based mechanism. *J Biol Chem* **279**, 47792-8.

**van Meer, G.** (1989). Lipid traffic in animal cells. *Annu Rev Cell Biol* **5**, 247-75.

**Vereb, G., Szollosi, J., Matko, J., Nagy, P., Farkas, T., Vigh, L., Matyus, L., Waldmann, T. A. and Damjanovich, S.** (2003). Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8053-8.

**Veri, M. C., DeBell, K. E., Seminario, M. C., DiBaldassarre, A., Reischl, I., Rawat, R., Graham, L., Noviello, C., Rellahan, B. L., Miscia, S. et al.** (2001). Membrane raft-dependent regulation of phospholipase Cgamma-1 activation in T lymphocytes. *Mol Cell Biol* **21**, 6939-50.

**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**, 353-63.

**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**, 2424-34.

**Vitale, N., Chasserot-Golaz, S., Bailly, Y., Morinaga, N., Frohman, M. A. and Bader, M. F.** (2002). Calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles requires the activation of ADP-ribosylation factor (ARF)6 by ARF nucleotide binding site opener at the plasma membrane. *J Cell Biol* **159**, 79-89.

**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**, 581-91.

## W

- Waisman, D. M.** (1995). Annexin II tetramer: structure and function. *Mol Cell Biochem* **149-150**, 301-22.
- Wang, P., Chintagari, N. R., Gou, D., Su, L. and Liu, L.** (2007). Physical and Functional Interactions of SNAP-23 with Annexin A2. *Am J Respir Cell Mol Biol*.
- Wang, S. and Hsu, S. C.** (2006). The molecular mechanisms of the mammalian exocyst complex in exocytosis. *Biochem Soc Trans* **34**, 687-90.
- Wawrezynieck, L., Rigneault, H., Marguet, D. and Lenne, P. F.** (2005). Fluorescence correlation spectroscopy diffusion laws to probe the submicron cell membrane organization. *Biophys J* **89**, 4029-42.
- Weerth, S. H., Holtzclaw, L. A. and Russell, J. T.** (2007). Signaling proteins in raft-like microdomains are essential for Ca<sup>2+</sup> wave propagation in glial cells. *Cell Calcium* **41**, 155-67.
- Wienisch, M. and Klingauf, J.** (2006). Vesicular proteins exocytosed and subsequently retrieved by compensatory endocytosis are nonidentical. *Nat Neurosci* **9**, 1019-27.
- Wilson, B. S., Steinberg, S. L., Liederman, K., Pfeiffer, J. R., Surviladze, Z., Zhang, J., Samelson, L. E., Yang, L. H., Kotula, P. G. and Oliver, J. M.** (2004). Markers for detergent-resistant lipid rafts occupy distinct and dynamic domains in native membranes. *Mol Biol Cell* **15**, 2580-92.
- Winkler, H.** (1997). Membrane composition of adrenergic large and small dense cored vesicles and of synaptic vesicles: consequences for their biogenesis. *Neurochem Res* **22**, 921-32.
- Wu, M., Holowka, D., Craighead, H. G. and Baird, B.** (2004). Visualization of plasma membrane compartmentalization with patterned lipid bilayers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13798-803.

## Y

- Yan, G., Luo, W., Lu, Z., Luo, X., Li, L., Liu, S., Liu, Y., Tang, M., Dong, Z. and Cao, Y.** (2007). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 mediates phosphorylation and nuclear translocation of annexin A2 by activating PKC pathway. *Cell Signal* **19**, 341-8.
- Yang, B., Gonzalez, L., Jr., Prekeris, R., Steegmaier, M., Advani, R. J. and Scheller, R. H.** (1999). SNARE interactions are not selective. Implications for membrane fusion specificity. *J Biol Chem* **274**, 5649-53.
- Yin, H. L. and Janmey, P. A.** (2003). Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Physiol* **65**, 761-89.
- Yona, S., Heinsbroek, S. E., Peiser, L., Gordon, S., Perretti, M. and Flower, R. J.** (2006). Impaired phagocytic mechanism in annexin 1 null macrophages. *Br J Pharmacol* **148**, 469-77.
- Yoo, S. H., You, S. H. and Huh, Y. H.** (2005). Presence of syntaxin 1A in secretory granules of chromaffin cells and interaction with chromogranins A and B. *FEBS Lett* **579**, 222-8.

## Z

- Zeniou-Meyer, M., Zabari, N., Ashery, U., Chasserot-Golaz, S., Haeberle, A. M., Demais, V., Bailly, Y., Gottfried, I., Nakanishi, H., Neiman, A. M. et al.** (2007).

Phospholipase D1 production of phosphatidic acid at the plasma membrane promotes exocytosis of large dense-core granules at a late stage. *J Biol Chem* **282**, 21746-57.

**Zhang, L., Marcu, M. G., Nau-Staudt, K. and Trifaro, J. M.** (1996). Recombinant scinderin enhances exocytosis, an effect blocked by two scinderin-derived actin-binding peptides and PIP2. *Neuron* **17**, 287-96.

**Zhao, W. Q., Waisman, D. M. and Grimaldi, M.** (2004). Specific localization of the annexin II heterotetramer in brain lipid raft fractions and its changes in spatial learning. *J Neurochem* **90**, 609-20.

**Zhu, D., Xiong, W. C. and Mei, L.** (2006). Lipid rafts serve as a signaling platform for nicotinic acetylcholine receptor clustering. *J Neurosci* **26**, 4841-51.

**Zimmerberg, J. and Chernomordik, L. V.** (1999). Membrane fusion. *Adv Drug Deliv Rev* **38**, 197-205.

**Zobiack, N., Rescher, U., Laarmann, S., Michgehl, S., Schmidt, M. A. and Gerke, V.** (2002). Cell-surface attachment of pedestal-forming enteropathogenic *E. coli* induces a clustering of raft components and a recruitment of annexin 2. *J Cell Sci* **115**, 91-8.

**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**, 4896-908.