

Thèse présentée en vue d'obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg
Ecole doctorale Sciences de la vie et de la santé

Fanny MOMBOISSE

Dynamique des lipides au cours du cycle d'exo-endocytose dans les cellules neuroendocrines : rôle des protéines Rac1 et Scramblase

Soutenue publiquement le 30 avril 2009

Membres du jury:

Dr. Marie-Claude Kilhoffer, Professeur Université de Strasbourg-Examinatrice
Dr. Christophe Lamaze, DR2, Rapporteur externe
Dr. Romano Regazzi, Professeur associé, Rapporteur externe
Dr. Sylvie Friant, CR1, Rapporteur interne
Dr. Claire Desnos, CR1, Examinatrice
Dr. Stéphane Gasman, CR1, Directeur de thèse

Thèse présentée en vue d'obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg
Ecole doctorale Sciences de la vie et de la santé

Fanny MOMBOISSE

Dynamique des lipides au cours du cycle d'exo-endocytose dans les cellules neuroendocrines : rôle des protéines Rac1 et Scramblase

Soutenue publiquement le 30 avril 2009

Membres du jury:

Dr. Marie-Claude Kilhoffer, Professeur Université de Strasbourg-Examinatrice
Dr. Christophe Lamaze, DR2, Rapporteur externe
Dr. Romano Regazzi, Professeur associé, Rapporteur externe
Dr. Sylvie Friant, CR1, Rapporteur interne
Dr. Claire Desnos, CR1, Examinatrice
Dr. Stéphane Gasman, CR1, Directeur de thèse

A mes parents, pour leur soutien

A mon frère

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail de thèse. Je tiens à remercier Marie-Claude Kilhoffer, Professeur de l'université de Strasbourg, qui malgré une thématique de recherche un peu éloignée a bien voulu participer et présider ce jury. Les rapporteurs externes, Christophe Lamaze de l'institut Curie, minorité active et spécialiste de l'endocytose et Romano Regazzi de l'université de Lausanne et spécialiste de l'exocytose. Sylvie Friant de l'IPCB à Strasbourg, rapportrice interne et spécialiste du trafic cellulaire. Merci également à Claire Desnos, de l'IBPC de Paris, pour son expertise en exocytose. Je les remercie pour leurs conseils, les échanges que nous avons pu avoir et la discussion le jour J qui fût un réel plaisir.

Mon arrivée de « France de l'intérieur » fût quelque peu chaotique et je souhaiterais remercier Marie-France Bader de m'avoir accueillie dans son laboratoire et soutenue dans cette période particulière ainsi que tout au long de mon doctorat. J'ai beaucoup apprécié sa pertinence et ses conseils scientifiques toujours avisés.

Je tiens à remercier particulièrement mon directeur de thèse, Stéphane Gasman. Je le remercie pour sa disponibilité, sa patience, sa confiance, ses conseils, son humour... Travailler avec lui fût très agréable et je me souviendrai longtemps des réunions de travail en terrasse de café, des discussions scientifiques (mais pas que... il faudrait qu'on pense à la terminer cette fameuse de Villard... !), des Gasman Team Party, des « rock around the clock », des concerts de jazz, du bon vin... « wee kip in touch » ! Un petit adage pour les prochains doctorants : « si sourcil levé, timer fait sonner... »

Un grand merci à Valérie Calco, enfin surtout celle d'après 12h... Elle m'a formé et conseillé en biologie moléculaire, elle a assuré la culture des (f..... !) PC12 et a réalisé des expériences pour le projet Rac (sapo, sapo, saponine !!!). Merci pour tous les moments de rigolades, de déconne dans le labo mais aussi pour les sorties théâtre, ciné, resto et week end rando! Maintenant, tu as intérêt à venir me voir aux US Valou !!!

Je remercie Nicolas Vitale avec qui nous avons collaboré sur le projet Rac. Le travail a finalement porté ses fruits... Je le remercie pour ses réponses mails « éclair », ses blagues et pour avoir répondu à mes 705 questions... (une par jour ouvré, c'était le cotât autorisé...)

Merci à Etienne Lonchamp (sans G !), qui, en plus d'avoir participé au projet « Rac » au cours de son DEA, a assuré dignement le poste de directeur des rencontres du vendredi. Longue vie à elles...

Le projet endocytose a été débuté par Mara Ceridono, post-doctorante dans la « Gasman team ». Je la remercie de m'avoir initié aux tests d'internalisation (et je n'oublierai pas que le foot est un sujet sensible pour les Italiens !). Stéphane Ory, m'a beaucoup appris sur les secrets de la quantification en imagerie. Merci pour son regard critique et pour les longues discussions scientifiques mais également sur les us et coutumes étranges de nos amis les ricains... Merci à la petite dernière de la Team, Olga Gubar, je lui souhaite beaucoup de bonheur et de réussite pour la suite...

Je souhaite remercier l'ensemble des membres de « l'équipe Bader » avec qui j'ai beaucoup appris durant cette thèse (et dans la bonne humeur !) Merci à Nancy Grant pour ses conseils en biochimie, en anglais et en cuisine! J'ai beaucoup apprécié son accent charmant, sa gentillesse et les pièces de théâtres (quelquefois particulières... ;) que nous avons vu ensemble... Pour continuer dans les « stocks hamsters », je remercie Gaby Ulrich pour ses corrections de dernière minute et sa gestion rigoureuse des tâches collectives... (L'Allemagne n'est pas si loin...). J'ai passé de bons moments en compagnie de Maria Zeniou-Meyer, notamment lors des multiples manips PLD réalisées côte à côte (c'est une fille !!). Je la remercie pour ses conseils et sa gentillesse. Merci à Tam Thaouly pour avoir assuré les cultures de nos chromaffines et pour ses « hello » enthousiastes ! Je remercie également Sylvette Chasserot-Golaz pour tous les conseils avisés, qu'ils soient d'ordre scientifique ou d'ordre chiro-ostéo-kinéso-thérapeutiques... Jarka Ciesielski-treska et ses randonnées au clair de lune, Petra Tryoen dit « Petrouschka » pour son brin de folie et son humour. Je remercie les doctorants pour les bons moments passés « à » et « en dehors de » la paillasse et particulièrement ma « classarde » Aurélie Béglé, pour sa fantaisie, son humour et son soutien... (sans rancune pour les mégots !)

Je n'oublierai pas « NSN »; les conversations (et les repas) surréalistes de Guy, les chants, petits fours et conseils culinaires d'Anne-Marie, les anecdotes cocasses de Corinne, les « bon plans » de Dominique, les discussions sur « les fondements du peuple américains » ou « le syndicalisme en France » avec mon voisin de bureau Emmanuel, le rire, l'efficacité et la bonne humeur de Cédric, les sifflotements de la Humeau team, les « NSN nights » (faudrait penser à la breveté cette T...V... !), la liste noire de Stéphanie, les discussions philosophiques du midi à la cafet... (entre autre sur certains produits du catalogue La Redoute), les critiques des macs par Alex, les chamailleries avec Heitzi, les mails politiquement incorrects de Jean Luc, les discussions passionnantes mais pas forcément toujours intelligibles (pour moi du moins...) de notre puits de science, Bernard.... et bien sûr la Rothaus du vendredi soir !

Plus généralement, je remercie les doctorants de l'institut que j'ai pu côtoyer pendant ces années, toutes ces soirées passées ensemble, notre aventure théâtrale avec les Doctoneuros et la tournée internationale Estonienne resteront de très bons souvenirs ! Un merci tout particulier à Aurore (euh !!) Niemiec (vive les girafes !!), Domitille Boudard (fantomette pour les intimes), et Marie Kneib (et ses célèbres « Marinades ») pour leur soutien !

Je remercie également la bande des grimpeurs, El profesor Renaud, Nanou, Serge et Fred avec qui les efforts fournis pour effectuer une vertigineuse 5b étaient souvent récompensés par un pique nique ou une soirée Jazz-Vin-Fromage...

Merci à ma famille d'accueil Cantalo-Aveyronnaise pour tous les repas, les moqueries sur les alsaciens et leur accent ;), le foot au parc et l'approvisionnement en tome !

Je remercie une certaine Jacqueline M. Ces travaux ont pu mettre en évidence que la maîtrise de l'orthographe et de la grammaire n'étaient pas génétiquement transmissibles...

Enfin, je remercie tout spécialement Matthias Corrotte de m'avoir laissé une petite place à son bureau... et pour tout ce qu'il m'a apporté depuis... mdb in dc !

ABBREVIATIONS

ADP : adénosine diphosphate
AP-2: adaptator complex 2
ARN : acide ribonucléique
ARNi : acide ribonucléique interférent
ATP : adénosine triphosphate
BAR : Bin/amphiphysin/Rvs
DAG : diacylglycérol
DBH: dopamine β hydroxylase
DH : Dbl homolog
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer
GAP : GTPase activating protein
GDI : GDP dissociation inhibitor
GEF : guanine nucleotide exchange factor
GTP : guanosine triphosphate
hGH: human growth hormone
LPC: lysophosphatidylcholine
NPY: neuropeptide Y
PA : phosphatidic acid
PC : phosphatidylcholine
PE : phosphatidyléthanolamine
PFA : paraformaldéhyde
PH : pleckstrin homology
PI(3)P : phosphoinositide phosphate
PI(3,4,5)P3 : phosphoinositide (3,4,5) triphosphate
PI(4,5)P2 : phosphoinositide (4,5) biphosphate
PKC : protéine kinase C
PLD : phospholipase D
PX : Phox Homology
RRP : readily releasable pool

SNARE : soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor

SRP : slowly releasable pool

TIRF : total internal reflection fluorescence (florescence par onde évanescence)

UPP : unprimed ool

WASP : Wiskott-Aldrich syndrome protein

WAVE : WASP-family verprolin-homologous protein

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Localisation des glandes surrénales	6
Figure 2 : Représentation schématique d'une cellule chromaffine dans la glande médullosurrénale.....	7
Figure 3 : Innervation de la glande surrénale.....	8
Figure 4 : Coupe d'une cellule chromaffine vue en microscopie électronique à transmission.....	10
Figure 5 : Les différents pool de granules dans les cellules chromaffines.....	11
Figure 6: Biogenèse des granules à partir de la membrane de l'appareil de Golgi.....	12
Figure 7: Les différentes étapes de maturation du granule de sécrétion.....	13
Figure 8: Les étapes terminales de l'exocytose.....	16
Figure 9: Deux modèles proposés par Tsuboi et collaborateurs pour le mécanisme d'arrimage des granules de sécrétion.....	17
Figure 10: Le complexe SNARE.....	18
Figure 11: Le pore de fusion.....	19
Figure 12: Modèle d'un pore de fusion protéique impliquant la syntaxine.....	20
Figure 13: Illustration du modèle d'exocytose «Full Collapse» de Heuser.....	21
Figure 14 : Schéma représentant les trois principaux modes d'exocytose dans les cellules chromaffines.....	22
Figure 15 : La clathrine.....	25
Figure 16: Illustration des différentes étapes de l'endocytose dépendante de la clathrine.....	26
Figure 17: Domaines de la dynamine.....	27
Figure 18 : Les principales voies d'endocytose dans la cellule.....	28
Figure 19 : Illustration d'expériences de capacitance sur des cellules chromaffines.....	29
Figure 20 : Nomenclature des glycérophospholipides.....	31
Figure 21 : Structure de radeaux lipidiques.....	33
Figure 22: Synthèse et rôle du PI(4,5)P2 dans les processus de trafic membranaire.....	34
Figure 23: Rôles potentiels du PI(4,5)P2 au cours du cycle d'exo-endocytose des vésicules synaptiques.....	36
Figure 24 : Rôle du PA au cours de l'exocytose régulée des cellules chromaffines.....	37
Figure 25: Les différentes voies de synthèse du PA.....	38
Figure 26: Représentation de la structure de la PLD.....	39
Figure 27: Structure 3D du domaine G des GTPases et effet de la liaison au GTP sur la conformation de la GTPase.....	42

Figure 28: La famille des GTPases Rho.....	43
Figure 29: Illustration résumant les fonctions cellulaires au cours desquelles les GTPases Rho ont été mis en évidence.....	44
Figure 30 : Processus de polymérisation de l'actine.....	45
Figure 31: Effet de l'activation de RhoA, Cdc42 ou Rac sur la polymérisation des filaments d'actine.....	46
Figure 32: Implication des GTPases de la famille Rho dans le trafic vésiculaire.....	47
Figure 33 : Cycle d'activation/inactivation des protéines Rho.....	48
Figure 34 : Distribution intracellulaire des protéines Cdc42 et RhoA dans des cellules chromaffines.....	53
Figure 35: Schéma général regroupant l'ensemble des données obtenues au cours de la publication 1.....	57
Figure 36: Comparaison du marquage de l'actine par la phalloïdine-rhodamine sur des cellules chromaffines bovines au cours de deux études différentes.....	58
Figure 37: Effet de l'expression de l'ARN interférent Rac sur le cortex d'actine dans les cellules PC12.....	58
Figure 38: Le cytosquelette d'actine vu par tomographie.....	58
Figure 39: Représentation schématique de quatre hypothèses pouvant expliquer la régulation de l'activité de la PLD1 par les GTPases Rac1 et ARF6 au cours de l'exocytose régulée.....	60
Figure 40: Représentation schématique du fonctionnement d'une sonde Raichu.....	61
Figure 41: Régulation de l'activité GAP de CdGAP par l'intersectin dans une lignée de fibroblastes.....	62
Figure 42: Représentation schématique des trois types d'enzymes permettant la translocation des glycérophospholipides à la membrane plasmique.....	65
Figure 43: Principe de la microscopie TIRF.....	69
Figure 44: Principe du test d'internalisation de la DBH.....	70
Figure 45 : Effet du dynasore sur l'internalisation de DBH dans les cellules chromaffines.....	72
Figure 46 : Effet des mutants Dynamine 1K44A et Dynamin 2K44A sur l'internalisation de DBH dans les cellules chromaffines.....	73
Figure 47: Schéma général regroupant l'ensemble des données obtenues au cours de la publication 2.....	74
Figure 48 : Principe de la technique d'ampérométrie.....	75
Figure 49: Représentation schématique des principaux compartiments intracellulaires.....	78
Figure 50 : Principe de l'ARN interférent en épingle à cheveux (Small Hairpin).....	94

Figure 51 : Méthode de quantification de la hGH par le Kit « hGH ELISA » (Roche Diagnostics).....	102
Figure 52 : Méthode de quantification de l'activité de la PLD par le Kit « Amplex red Phospholipase D assay » (Molecular Probes).....	103
Figure 53 : Méthode de quantification de l'internalisation de la DBH utilisant la transformation de carte de distance Euclidienne.....	109

SOMMAIRE

AVANT PROPOS	1
INTRODUCTION GENERALE : L'EXO-ENDOCYTOSE DANS LES CELLULES CHROMAFFINES ...	4
I- GENERALITES SUR L'EXOCYTOSE REGULEE.....	4
A- Définition et rôles physiologiques.....	4
B- Modèles d'études de l'exocytose régulée.....	5
1- Variétés des types cellulaires.....	5
2- Notre modèle d'étude : Cellules chromaffines et PC12.....	6
a- Présentation des cellules.....	6
b- Les cellules en culture.....	7
c- Stimulation de l'exocytose.....	8
d- Importance du calcium.....	9
C- Le granule de sécrétion dans les cellules chromaffines : description et parcours.....	10
1- Caractéristiques et composition du granule à cœur dense.....	10
2- Notion de pool de granule.....	11
3- De la naissance à la formation du granule.....	12
a- Biogénèse et protéines granulogènes.....	12
b- Maturation.....	12
4- Fonction du cytosquelette dans les transport des granules jusqu'à la périphérie cellulaire.....	13
a- Les microtubules pour le transport longue distance.....	13
b- Rôle de l'actine : barrière ou transport à courte distance ?.....	14
5- A la membrane plasmique.....	15
a- L'accostage.....	16
b- L'Arrimage.....	17
c- L'Amorçage.....	17
6- La fusion.....	19
a- Le pore de fusion.....	19
b- Les acteurs protéiques importants pour la fusion.....	20
c- Les différents modes d'exocytose.....	21
d- Les régulateurs de la dynamique du pore de fusion.....	23
7- Le désassemblage du complexe SNARE.....	24
II- L'ENDOCYTOSE COMPENSATRICE.....	25
A- Les différents voies d'endocytose mises en évidence dans la cellule.....	25
1- Endocytose dépendante de la clathrine.....	25
2- Les autres voies d'endocytoses.....	27
3- Une réalité plus complexe ?.....	28
B- Les mécanismes moléculaires de l'endocytose compensatrice dans les cellules chromaffines.....	29
1- Endocytose après « Kiss and Run ».....	30
2- Endocytose après « Full Collapse ».....	30

III-	IMPORTANCE DES LIPIDES DANS LES MECANISMES D'EXO-ENDOCYTOSE	31
A-	La membrane plasmique et son environnement lipidique.....	31
1-	La membrane plasmique et son environnement biologique.....	31
2-	Les rafts.....	32
B-	Lipides impliqués dans les processus d'exo-endocytose.....	34
1-	Le phosphatidylinositol (4-5)-bisphosphate.....	34
a-	PI(4,5)P ₂ et exocytose	34
b-	PI(4,5)P ₂ et endocytose.....	36
2-	L'acide phosphatidique.....	36
a-	Rôle dans les courbures membranaires.....	37
b-	Activation de partenaires.....	37
c-	La régulation de la formation de PA par la Phospholipase D	38
3-	Le Phosphatidylsérine.....	39

REGULATION DE LA PRODUCTION D'ACIDE PHOSPHATIDIQUE AU COURS DE

L'EXOCYTOSE : ROLE DE RAC1

I-	INTRODUCTION SUR LES GTPASES MONOMERIQUES	41
A-	La superfamille des Ras.....	41
B-	Mode de fonctionnement.....	42
C-	Les GTPases de la famille Rho.....	42
1-	Généralités.....	42
2-	Outils permettant d'étudier les GTPases Rho	43
3-	Voies effectrices majeures.....	44
a-	Rho et régulation du cytosquelette d'actine	44
b-	Rho et dynamique des lipides.....	45
4-	Rho et trafic membranaire	46
a-	Dynamique de la membrane plasmique.....	46
b-	Trafic vésiculaire.....	46
5-	Modes de régulation des GTPases Rho.....	48
a-	Les GEF.....	48
b-	Les GAP.....	51
c-	Les GDI	51
II-	ROLES DES GTPASES RHO AU COURS DE L'EXOCYTOSE REGULEE DANS LES CELLULES CHROMAFFINES	52
A-	RhoA et Cdc42 : contrôle de la dynamique de l'actine.....	52
1-	Le rôle de RhoA	52
2-	Rôle de Cdc42.....	53
B-	Quel rôle pour Rac ?	53
1-	Etat des lieux des données	53
2-	Publication 1 : « β PIX-activated Rac1 stimulates the activation of phospholipase D, which is associated with exocytosis in neuroendocrine cells »	56
3-	Discussion des résultats obtenus et perspectives.....	57

a-	Rac1 et l'actine ?.....	57
b-	Un rôle de Rac1 seulement dans les phases tardives de l'exocytose ?.....	58
c-	Rac1-ARF6-RSK2 : comment y voir plus clair ?.....	59
d-	Quelle GAP pour Rac1 ?.....	62
III-	CONCLUSIONS.....	63
MECANISMES MOLECULAIRES DE L'ENDOCYTOSE COMPENSATRICE: ROLE DE LA		
SCRAMBLASE 1 64		
I-	DYNAMIQUE TRANSMEMBRANAIRE DES LIPIDES : UNE QUESTION DE TRANSPORTEURS.....	64
A-	Généralités.....	64
B-	Les scramblases.....	65
II-	SCRAMBLASES ET TRANSPORT DE PHOSPHATIDYLSERINE DANS LES MECANISMES D'EXO-ENDOCYTOSE	66
A-	Etat des lieux.....	66
B-	Rôle potentiel au cours de l'endocytose compensatrice dans les cellules chromaffines	67
1-	Bilan des données actuelles.....	67
2-	Intérêt de la mise au point d'un test d'internalisation.....	68
III-	PUBLICATION 2 : « CALCIUM-DEPENDENT SCRAMBLASE IS REQUIRED FOR SECRETORY GRANULE	
	RECYCLING IN NEUROENDOCRINE CELLS ».....	71
IV-	RESULTATS COMPLEMENTAIRES : IMPLICATION DE LA DYNAMINE 2 DANS L'INTERNALISATION DES	
	MEMBRANES DE GRANULES APRES EXOCYTOSE.....	72
V-	DISCUSSION.....	73
A-	Importance des dynamines.....	73
B-	Un couplage spatial de l'exo-endocytose ?.....	75
C-	Un facteur à l'origine du couplage exo-endocytose ?.....	76
D-	Quel devenir pour le granule ?.....	77
E-	Rôle de la translocation du phosphatidylsérine.....	78
F-	La Scramblase.....	79
VI-	CONCLUSION.....	80
DISCUSSION GENERALE 81		
I-	CRITIQUE DE L'APPROCHE METHODOLOGIQUE.....	81
A-	Mode de stimulation.....	81
B-	Durée de la stimulation.....	82
C-	Mesure de l'exo-endocytose.....	83
1-	Mesure de l'activité sécrétrice par le test de sécrétion de hGH.....	83
2-	Qu'étudions-nous dans nos conditions expérimentales ?.....	83
II-	RAC1 ET L'ENDOCYTOSE COMPENSATRICE ?.....	84

III-	FORMATION DE PA, TRANSLOCATION DE PS ET « KISS AND RUN » : QUELLE COMPATIBILITE ?	85
1-	La formation d'acide phosphatidique est-elle nécessaire à une exocytose de type « Kiss and Run » ?	85
2-	Translocation de phosphatidylsérine dans les cellules chromaffines : un signal pour une endocytose après « Full Collapse » ?	86
IV-	QU'EN EST-IL DANS LES NEURONES?.....	87
A-	Quel mode d'exo-endocytose dans les neurones ?	87
B-	La cellule chromaffine et le neurone : deux modèles bien différents.....	88
C-	La formation d'acide phosphatidique a-t-elle lieu dans les cellules neuronales?.....	89
D-	La translocation de phosphatidylsérine par la Scramblase peut-elle avoir lieu dans les neurones ?	90
V-	CONCLUSION.....	91
	MATERIELS ET METHODES	93
I-	TECHNIQUES ET OUTILS DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	93
A-	Les ARN interférents (ARNi).....	93
B-	Les plasmides.....	93
C-	Mutagenèse dirigée	94
D-	Transformation et culture bactérienne	95
E-	Purification de plasmides recombinants : maxi-préparation d'ADN (Kit Qiagen)	95
II-	CULTURE CELLULAIRE ET TRANSFECTION.....	96
A-	La lignée cellulaire PC12.....	96
1-	Culture	96
2-	Transfection.....	96
B-	Les cellules chromaffines de bœuf en culture primaire	97
1-	Mise en culture	97
2-	Transfection.....	98
III-	TECHNIQUES BIOCHIMIQUES	99
A-	Extraction et dosage de protéines	99
B-	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, électrotransfert sur membrane de nitrocellulose et immunodétection (Western Blot)	99
1-	Anticorps utilisés.....	99
2-	Electrophorèse dénaturante.....	99
3-	Electrotransfert sur membrane de nitrocellulose.....	100
4-	Immunodétection	100
C-	Test de perméabilisation à la saponine	101
D-	Mesure de l'activité de sécrétion de GH sur les cellules PC12	101
E-	Mesure de l'activité PLD sur les cellules PC12	102
F-	Mesure de l'activité Rac sur les cellules PC12.....	104
1-	Technique de Pull Down.....	104

2- Rac-G-Lysat	105
G- Expériences de biotinylation sur les cellules chromaffines.....	105
IV- TECHNIQUE UTILISANT LA MICROSCOPIE.....	106
A- Anticorps et toxines utilisés	106
B- Immunocytochimie et microscopie confocale.....	106
1- Immunocytochimie.....	106
2- Microscopie confocale.....	108
3- Quantification.....	108
C- Test d'internalisation de la DBH en microscopie électronique.....	109
V- TAMPONS ET SOLUTIONS UTILISEES	110
A- Technique de biologie moléculaire :.....	110
B- Milieux de lavages et de stimulations	110
C- Techniques biochimiques	111
D- Technique utilisant la microscopie.....	112
BIBLIOGRAPHIQUE	113
ANNEXE	135

Avant propos

L'exocytose régulée par le calcium est au coeur de nombreuses fonctions physiologiques essentielles telles que la neurotransmission et la sécrétion hormonale. C'est un processus complexe qui requiert un remodelage du cytosquelette d'actine, une réorganisation spécifique des lipides, et l'assemblage d'éléments protéiques permettant l'arrimage puis la fusion des vésicules de sécrétion à la membrane plasmique. L'équipe du Dr Marie-France Bader s'emploie à décortiquer les mécanismes moléculaires qui contrôlent ce processus dans les cellules neuroendocrines. Au cours de ces dix dernières années, les travaux issus du laboratoire ont permis, entre autre, de montrer l'importance fonctionnelle des GTPases monomériques de type Rho et Arf dans la dynamique du cytosquelette d'actine et le métabolisme des lipides au cours de l'exocytose dans les cellules chromaffines de la glande medullosurénale.

A mon arrivée en doctorat fin 2005, le Dr. Stéphane Gasman avait déjà démontré le rôle de RhoA et de Cdc42 dans la réorganisation de l'actine induite au cours de l'exocytose. De plus, quelques résultats préliminaires lui suggéraient également l'intervention potentielle de Rac1, une autre GTPase de la famille Rho. Le but de mon projet de thèse fût alors d'étudier le rôle Rac1 au cours de l'exocytose régulée dans les cellules PC12. Après avoir vérifié son implication, je me suis focalisée sur l'étude des voies effectrices et régulatrices. Les objectifs ont été atteints puisque, après deux ans et demi d'expérimentation, j'ai pu mettre en évidence une voie moléculaire faisant intervenir Scribble, β Pix, Rac1 et la phospholipase D. En parallèle, je me suis intéressée à un tout autre aspect de la sécrétion neuroendocrine, à savoir, l'endocytose compensatrice. En effet, lorsque j'ai débuté mes travaux sur Rac1, Stéphane Gasman venait de mettre sur pied, avec le Dr. Mara Ceridono (post-doctorante au laboratoire), un projet visant à caractériser les mécanismes contrôlant la recapture des granules de sécrétion après l'exocytose. Deux aspects de ce projet ont particulièrement attiré mon attention : le rôle différentiel des isoformes 1 et 2 de la dynamine ainsi que l'implication potentielle du phosphatidylsérine et de l'enzyme permettant son transport au travers de la membrane plasmique, la scramblase. C'est autour de ces deux axes que j'ai donc participé au projet mené par Mara Céridono.

Ce manuscrit fait la synthèse de l'ensemble de ces travaux et s'articule autour de quatre grandes parties. La première partie introduira de façon générale le processus d'exo-endocytose régulée dans les cellules chromaffines. J'ai délibérément choisi de concentrer l'introduction sur notre modèle cellulaire car, lorsque nous abordons des notions d'exo-endocytose, le type cellulaire devient primordial et d'importantes variabilités peuvent apparaître d'un modèle à l'autre. Je commencerai donc par une présentation du modèle utilisé, (cellules chromaffines et PC12) puis je décrirai le cycle du granule de sécrétion en allant de sa biogénèse à l'étape de fusion avec la membrane plasmique. J'aborderai ensuite la notion d'endocytose compensatrice qui fait suite à l'exocytose régulée dans les cellules sécrétrices. Pour cela, je décrirai d'abord très brièvement les mécanismes d'endocytose classiquement retrouvés dans les cellules puis je présenterai l'état des connaissances actuelles sur les mécanismes moléculaires impliqués spécifiquement au cours du processus d'endocytose compensatrice dans les cellules chromaffines. Enfin, le troisième volet de cette première partie traitera de l'importance de la régulation des lipides au cours des mécanismes d'exocytose et d'endocytose et j'insisterai particulièrement sur trois d'entre eux : le phosphatidylinositol (4-5)-bisphosphate, l'acide phosphatidique et le phosphatidylsérine.

La deuxième partie du manuscrit abordera la question du rôle des protéines Rho au cours du processus d'exocytose. Après une présentation générale de cette famille de GTPases monomériques, j'insisterai sur leur importance au cours du trafic membranaire. J'entrerai alors dans le vif du sujet, en vous présentant les résultats de ma première publication qui mettent en évidence, pour la première fois, l'importance de Rac1 dans la régulation de la synthèse d'acide phosphatidique au cours des phases tardives de l'exocytose. A l'issue de cette publication, je discuterai de certaines notions qui n'ont pas été abordées dans la discussion de l'article.

La troisième partie sera consacrée à nos résultats concernant l'étude des mécanismes moléculaires régulant l'endocytose compensatrice dans les cellules chromaffines. Je ferai tout d'abord une brève introduction sur la dynamique transmembranaire des lipides de la membrane plasmique en insistant sur le transporteur qui a retenu notre attention au cours de cette étude : la scramblase. Je présenterai ensuite nos résultats sous forme d'une publication à soumettre dans laquelle je suis deuxième auteur ainsi que sous forme de résultats complémentaires. L'ensemble des données présentées ici soulève quatre aspects importants de

notre travail : la mise au point d'un test de recapture des composants granulaires, la notion de recapture spécifique et intégrée de la membrane granulaire, la caractérisation d'une partie de la voie d'endocytose des granules et enfin, l'importance de la scramblase dans ce processus. Avant de conclure cette partie, je discuterai de certains détails qui me tiennent à cœur.

Enfin, au cours de la quatrième partie, j'aborderai quelques points afin de replacer l'ensemble de mes données dans un contexte plus général. J'expliquerai tout d'abord les limites et les avantages de nos approches méthodologiques. J'étudierai la possibilité d'un rôle de Rac1 dans l'endocytose compensatrice. Je poserai la question de la place des différents lipides étudiés (PA et PS) au sein des différents modes de d'exo-endocytose connus. Enfin, je me demanderai dans quelle mesure les résultats obtenus au cours de ce doctorat sont généralisables à d'autres systèmes et notamment aux neurones.

L'objectif de ce manuscrit est de donner une vue d'ensemble des processus d'exo-endocytose dans les cellules chromaffines et de mettre en lumière l'intervention indispensable des GTPases Rho et le rôle crucial de la régulation de la dynamique des phospholipides au cœur de ces phénomènes.

Bonne lecture.

Introduction générale : l'exo-endocytose dans les cellules chromaffines

I- Généralités sur l'exocytose régulée

A- Définition et rôles physiologiques

Étymologiquement l'exocytose se définit comme le processus par lequel la cellule libère des composés dans le milieu extracellulaire. Cependant, cette définition première s'est élargie et à l'heure actuelle, on trouve régulièrement sous les termes « d'exocytose régulée » tout processus cellulaire au cours duquel des membranes d'organelles cytoplasmiques fusionnent avec la membrane plasmique après réception par la cellule d'un stimuli externe.

L'exocytose régulée peut ainsi assurer un apport d'éléments à la membrane plasmique comme des transporteurs, des récepteurs ou des canaux ioniques. Les exemples sont multiples et nous pouvons notamment citer l'apport du transporteur du glucose (GLUT4) dans les cellules pancréatiques, l'apport de membrane lors de la croissance cellulaire des neurones ou encore l'externalisation de pompes à protons dans le rein après stimulation des cellules par la vasopressine (Chiergatti and Meldolesi, 2005). L'exocytose régulée est ainsi indispensable à divers processus tels que la phagocytose, la réparation membranaire ou la polarité cellulaire (Burgoyne and Morgan, 2003). Cette exocytose est définie comme une exocytose régulée non sécrétrice.

Plus classiquement, l'exocytose régulée est considérée comme le mécanisme assurant la sécrétion de messagers chimiques ou protéiques dans le milieu extracellulaire, permettant ainsi aux principaux systèmes de commande de l'organisme de transmettre de l'information. C'est le cas par exemple des systèmes nerveux et neuroendocriniens qui libèrent respectivement les neurotransmetteurs et les hormones. La sécrétion correspond à l'ensemble des étapes qui vont de la synthèse à l'excrétion d'une molécule dans le milieu extra-cellulaire, en passant par son stockage et sa maturation dans les vésicules de sécrétion. L'exocytose représente la phase finale de la sécrétion au cours de laquelle la membrane vésiculaire fusionne avec la membrane plasmique.

B- Modèles d'études de l'exocytose régulée

1- Variétés des types cellulaires

Bien que les levures ne possèdent pas à proprement parler d'une exocytose régulée classique, cet organisme contribue de façon significative à la compréhension des mécanismes du transport vésiculaire. Il présente l'avantage de pouvoir être modifié génétiquement de façon relativement aisée. De plus, les résultats obtenus chez la levure sont régulièrement transposables à d'autres organismes (Ferro-Novick and Jahn, 1994 ; Brennwald and Rossi, 2007).

Dans les organismes pluricellulaires, l'exocytose régulée a lieu dans des cellules spécialisées et permet, entre autre, la libération de peptides, d'hormones ou de neurotransmetteurs contenus dans des vésicules de sécrétion. Parmi les cellules susceptibles d'effectuer une exocytose régulée, on répertorie les cellules hématopoïétiques, les neurones, les cellules endocrines, exocrines, et des cellules spécifiques comme les mélanocytes ou les cellules endothéliales. De ce fait, les modèles d'études employés pour appréhender ce mécanisme sont relativement variés.

Parmi les cellules endocrines, les cellules β pancréatiques (avec les lignées HIT ou MIN6) sont fréquemment employées dans l'étude de la régulation du processus d'exocytose régulée en partie du fait que de nombreuses pathologies comme le diabète sont liées à des défauts de sécrétion du pancréas. En plus des cellules pancréatiques, on retrouve les cellules neuroendocrines de l'hypophyse comme les lactotrophes, les mélanotrophes ainsi que les cellules chromaffines de la glande médullosurrénale (cf. page 6). Les cellules hématopoïétiques immunitaires sont concernées par les phénomènes de sécrétion lors de réponses immunitaires. Parmi celles ci, les granulocytes neutrophiles, les basophiles, ou encore les mastocytes. Les cellules des glandes parotides qui assurent la sécrétion salivaire, les cellules entérochromaffines (lignée BON) ou encore les cellules alvéolaires des poumons qui secrètent le surfactant sont aussi régulièrement étudiées (Burgoyne and Morgan, 2003). Enfin, le modèle le plus étudié mais probablement le plus complexe est le neurone. Au cours de la discussion générale, j'aborderai ce type de cellules bien particulier.

La machinerie moléculaire de l'exocytose est relativement bien conservée d'un type cellulaire à l'autre. Des processus communs sont admis comme l'implication des protéines SNARE ou encore l'importance du calcium. Cependant, et probablement du fait de la

A

Surrénale
droite

Surrénale
gauche



B

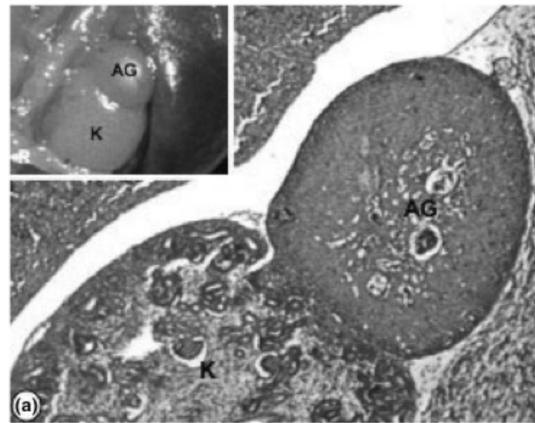


Figure 1 : Localisation des glandes surrénales. A- Schéma représentant les glandes surrénales situées au dessus de chaque rein. B- Acquisition macroscopique d'une glande surrénale (AG « Adrenal Gland ») et d'un rein (K « Kidney ») chez un fœtus de rat. D'après <http://www.wikinu.org/medecine> et Díaz-Flores, Gutiérrez et al. 2008.

diversité des fonctions physiologiques, les mécanismes d'exocytose présentent des variations notamment en terme de cinétique et de mode de régulation. Au cours de ce manuscrit, je présenterai les mécanismes moléculaires impliqués au cours de l'exocytose régulée et de l'endocytose compensatrice dans notre modèle d'étude : les cellules chromaffines et PC12.

2- Notre modèle d'étude : Cellules chromaffines et PC12

a- Présentation des cellules

Les systèmes endocriniens et neuroendocriniens exercent leur fonction de commande en libérant des hormones dans la circulation sanguine. Les cellules chromaffines sont des cellules issues de la glande surrénale (**Figure 1**). Elles ont été décrites pour la première fois à la fin du 19^{ème} siècle par Alfred Kohn. Leur nom est dû à la coloration qu'elles prennent en présence de sel de chrome. Cette glande située au dessus du rein est constituée d'une partie corticale, en périphérie, et d'une partie médullaire au centre. La partie corticale assure la libération d'un grand nombre d'hormones stéroïdes, gluco- et minéralo-corticoïdes, ainsi que des hormones androgènes (Idelman and Verdeti, 2000). La partie médullaire, quand à elle, est responsable de la sécrétion d'adrénaline et noradrénaline, mais également des protéines de la famille des chromogranines, divers peptides et d'autres hormones telles que la somatostatine ou le facteur atrial natriurétique. C'est dans cette partie médullaire que se trouvent les cellules chromaffines (Aunis and Langley, 1999 ; de Diego et al., 2008).

D'un point de vue embryologique, la corticosurrénale et la medullosurrénale ont des origines différentes. La corticosurrénale est issue de tissu mésodermique. La medullosurrénale provient de cellules de la crête neurale. Cette dernière va se fragmenter pour aboutir notamment à la formation de cellules souches des ganglions sympathiques, où sympathoblastes. Certaines de ces cellules vont migrer différemment des autres et permettre la formation du système paraganglionnaire dans lequel se trouve le phéochromoblaste, ébauche de la médullosurrénale. A la 8^{ème} semaine de développement, les cellules se présentent sous forme d'îlots dispersés au sein d'un cortex déjà plus évolué. La formation du tissu compact et très vascularisé aboutira à la partie centrale de cette glande (Díaz-Flores et al., 2008).

Les cellules chromaffines sont essentiellement formées de deux populations cellulaires différentes : les cellules adrénériques et noradrénériques. Les cellules adrénériques, sécrétant l'adrénaline et la noradrénaline, sont les plus nombreuses puisqu'elles représentent environ 80% de la population cellulaire totale. Les cellules noradrénériques, qui secrètent

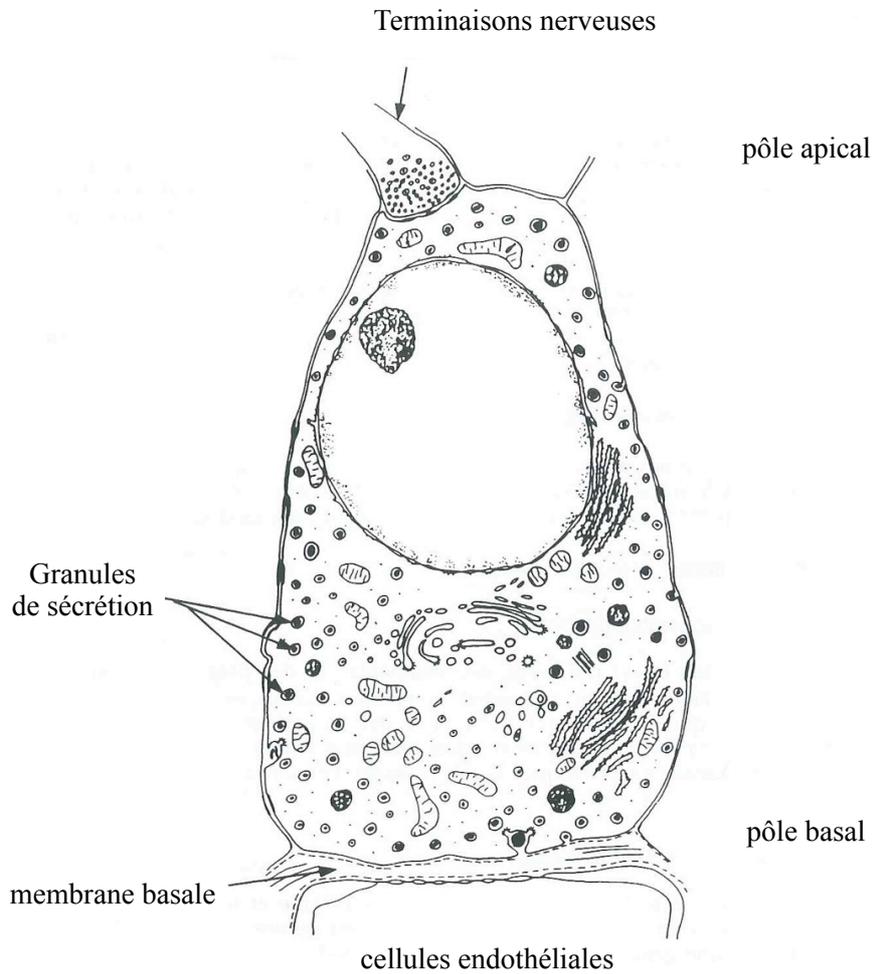


Figure 2 : Représentation schématique d'une cellule chromaffine dans la glande médulosurrénale. Une terminaison nerveuse est représentée au niveau du pôle apical de la cellule. Une membrane basale sépare la cellule chromaffine d'une cellule endothéliale au pôle basal.

seulement la noradrénaline, représentent environ 20% de la population totale et se situent préférentiellement au centre de la médullosurrénale. Notons cependant que la proportion de cellules adrénériques et noradrénériques est variable d'une espèce à l'autre.

Dans des conditions physiologiques normales, les catécholamines sont sécrétées à faible dose. Elles vont se fixer sur leurs récepteurs α et β adrénériques repartis sur différents tissus. Elles peuvent agir sur le système cardiovasculaire, afin de maintenir une pression sanguine constante, mais interviennent également dans la régulation du métabolisme du glucose ou des lipides (Idelman and Verdeti, 2000). Leurs rôles physiologiques dépendent, avant tout, de la dose et de la durée d'action. Ainsi, en situation de stress ou face à un danger, une plus large sécrétion va se produire pour mobiliser l'organisme dans une situation dite de « combat ou de fuite » (fight or flight). Cette libération importante va aboutir à des réactions physiologiques d'alarme telles que la tachycardie, l'augmentation de la glycémie, l'érection des poils, le relâchement des muscles intestinaux ou la dilatation de la pupille (de Diego et al., 2008).

b- Les cellules en culture

Dans l'organisme, les cellules chromaffines sont polarisées avec un contact au pôle apical avec les terminaisons nerveuses du nerf splanchnique et un contact au pôle basal avec les cellules endothéliales (**Figure 2**). Au laboratoire, nous réalisons des cultures primaires de cellules chromaffines bovines. Lorsqu'elles sont mises en culture, et après adhérence au support, les cellules chromaffines prennent une forme sphérique. La morphologie adoptée par la suite dépend avant tout de la nature du milieu dans lequel elles sont incubées (Bader et al., 1983). Après un traitement au NGF (Nerve Growth Factor), elles peuvent émettre des prolongement neuritiques (Bader et al., 1981). Dans nos conditions de culture, les cellules sont sphériques et conservent leur phénotype endocrinien. Ces cellules présentent de nombreux avantages techniques non négligeables.

Il est possible de récolter une grande quantité de cellules (environ $30 \cdot 10^6$) de cellules par glande surrénale de bœuf). Leur taille est relativement importante (15 à 20 μm), ce qui facilite les études sur cellule unique, comme la microinjection ou certaines techniques électrophysiologiques. Ces cellules possèdent des granules de sécrétion de grandes tailles ce qui rend plus aisée leur observation en microscopie optique ou électronique. Enfin, 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'hormones libérées par une cellule isolée, voire par

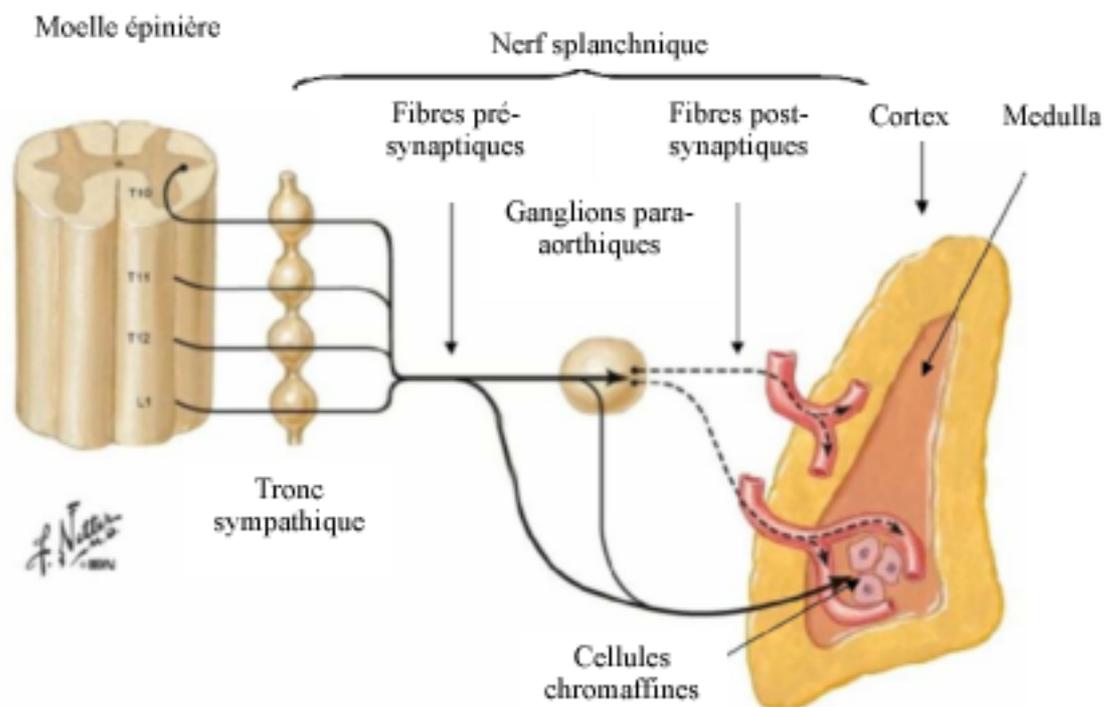


Figure 3 : Innervation de la glande surrénale. Les fibres nerveuses du nerf splanchnique innervent directement la région médullaire de la glande. Elles libèrent de l'acétylcholine qui stimule les récepteurs nicotiques des cellules chromaffines, déclenchant ainsi la libération du contenu granulaire dans le sang. D'après: <http://www.netterimages.com/>

un seul granule (Evanko, 2005). Cependant, comme toutes les cellules issues de cultures primaires, les cellules chromaffines présentent certains inconvénients et sont notamment difficilement transfectables. Le taux de transfection n'excède pas 30 %, ce qui rend difficile les études biochimiques. C'est la raison pour laquelle nous travaillons en parallèle sur la lignée de cellules PC12.

La lignée de cellules PC12 est issue d'un phéochromocytome de rat, une tumeur de la glande médullosurrénale. Cette tumeur touche principalement la population noradrénergique de la glande surrénale. Elle a été établie par Greene et Tischler en 1976 (Greene and Tischler, 1976). Les cellules PC12 possèdent des granules de sécrétion mais en plus petites quantités que les cellules chromaffines. La machinerie intra-cellulaire nécessaire à l'exocytose est comparable à celle présente dans les cellules chromaffines. Leur culture est beaucoup plus aisée et le taux de transfection peut atteindre 80%. Cependant, comme souvent pour les lignées cellulaires, un changement de phénotype peut avoir lieu après un certain nombre de passages des cellules ce qui peut se traduire par des variations dans les taux de sécrétion ou une modification de l'adhérence.

c- Stimulation de l'exocytose

Suite à un influx nerveux, les neurones pré-ganglionnaires dont les axones constituent le nerf splanchnique, vont libérer de l'acétylcholine qui se lie à des récepteurs ionotropiques nicotiniques/muscariniques présents à la membrane des cellules chromaffines (**Figure 3**). La stimulation de ces récepteurs aboutie à une entrée massive d'ion calcium et sodium ce qui va créer une légère dépolarisation membranaire. Cette dépolarisation va ouvrir des canaux sodium dépendant du voltage ce qui va générer une dépolarisation membranaire plus importante et aboutir à l'ouverture des canaux calciques dépendant du voltage. L'entrée rapide et massive d'ions Ca^{2+} dans la cellule est amplifiée par la libération de calcium depuis les stocks intracellulaires.

Au cours de nos expériences, nous déclenchons le processus d'exocytose en incubant les cellules dans des solutions de stimulation contenant soit de la nicotine (10 μ M), soit une concentration élevée de potassium (59 mM). La nicotine est un agoniste des récepteurs nicotiniques/muscariniques, la solution contenant une forte concentration en potassium va induire une dépolarisation membranaire.

d- Importance du calcium

La première étude établissant un lien entre l'exocytose régulée des catécholamines et le calcium a été réalisée *in vivo* par Douglas et Rubin en perfusant des glandes surrénales de chat avec différentes solutions. En absence de calcium, les auteurs n'observaient plus de sécrétion d'adrénaline (Douglas and Rubin, 1961). Depuis, l'importance du calcium a été confirmée par d'autres approches et notamment par l'utilisation de techniques de perméabilisation de la membrane plasmique (Bader et al., 1990).

Le calcium impliqué dans la régulation de l'exocytose ne provient pas uniquement du milieu extracellulaire mais il est également apporté par d'autres pool calciques (Cuchillo-Ibanez et al., 2002). Ainsi, le réticulum endoplasmique libère du calcium dans le cytoplasme au cours de l'exocytose *via* ses récepteurs sensibles à Inositol tri-phosphate (l'IP₃) (Alonso et al., 1999). La mitochondrie participe également à l'augmentation du calcium intracellulaire (Montero et al., 2000). De plus, les vésicules de sécrétion contiennent du calcium et possèdent sur leur membrane des récepteurs calciques. Cependant, leur implication dans la régulation du calcium intracellulaire au cours de l'exocytose n'est pas réellement démontrée (García et al., 2006). L'intervention de ces différentes sources de calcium crée un environnement calcique particulier. Nous le verrons plus loin, les vésicules de sécrétion ne sont pas réparties de façon homogène et la concentration nécessaire en calcium pour l'exocytose de chaque vésicule n'est pas la même en fonction de sa localisation. Pour les vésicules présentes à la membrane plasmique, une concentration de 3 μM est suffisante pour permettre l'exocytose (Voets, 2000). Pour induire l'exocytose des granules plus éloignés de la membrane plasmique, la concentration calcique doit être de l'ordre de 20 μM . Les mécanismes de régulation calciques sont relativement complexes à étudier.

Les partenaires moléculaires responsables du couplage entre l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire et l'exocytose régulée n'ont pas été clairement identifiés. Actuellement, il n'existe pas à proprement parler un senseur calcique unique. Comme nous le verrons plus loin, différentes protéines jouant un rôle important au cours de l'exocytose régulée possèdent des domaines sensibles au calcium. L'ensemble de ces facteurs pourrait agir de concert ou séquentiellement lors de différentes étapes, permettant ainsi une régulation très fine du processus d'exocytose.

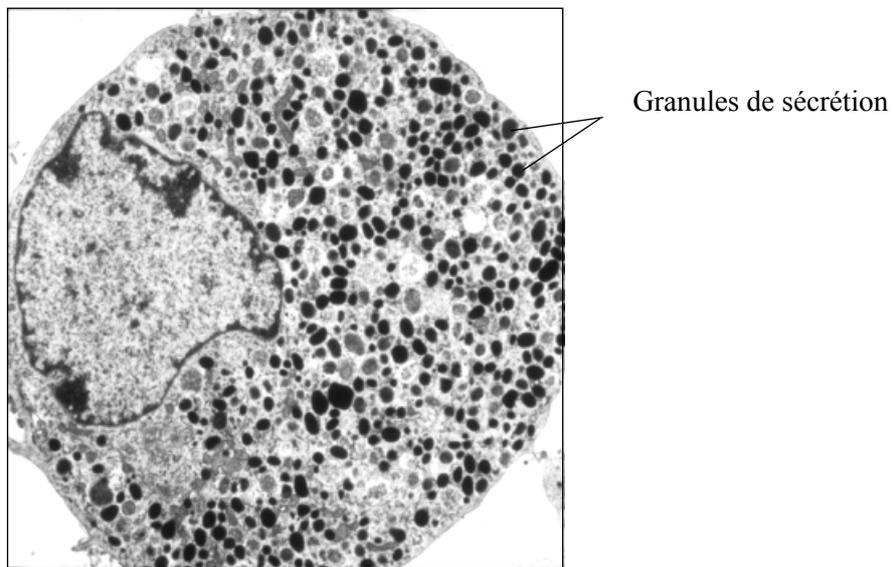


Figure 4 : Coupe d'une cellule chromaffine vue en microscopie électronique à transmission. D'après Aunis, 1981.

C- Le granule de sécrétion dans les cellules chromaffines : description et parcours

1- Caractéristiques et composition du granule à cœur dense

Dans les cellules neuroendocrines, les organites contenant les hormones sont appelées granules de sécrétion ou granules à cœur dense (LDCV pour Large Dense Core Vesicle). Dans les cellules chromaffines, ces granules présentent un diamètre variant de 60 à 350 nm et sont denses aux électrons ce qui les rend facilement identifiables en microscopie électronique (**Figure 4**). Ils occupent environ 13% du volume cytoplasmique des cellules chromaffines et chaque cellule peut en contenir jusqu'à 30 000 (Vitale et al., 1995).

En plus des catécholamines, la matrice des granules de sécrétion contient également différents composants peptidiques ainsi que quelques ions. Les principaux constituants sont présentés dans le tableau 1.

Composition de la matrice du granule	
Catécholamines	Adrénaline, noradrénaline, dopamine
Nucléotides	ATP, AMP, ADP, GTP, GDP, UDP
Enzymes	DBH (dopamine- β -hydroxylase), enképhalinase, acétylcholinestérase
Protéines	Chromogranines A et B, sécrétogranine II
Cofacteurs	Acide ascorbique
Peptides	Enképhalines/proenképhalines, neuropeptide Y, substance P, somatostatine, VIP, neurotensine, ANF, galanine, ...
Ions	Calcium, magnésium, potassium, sodium et chlore
Composition de la membrane du granule	
Lipides	Cholestérol, phospholipides, gangliosides, lysophosphatidylcholine
Protéines	Transporteurs de catécholamines, nucléotides, calcium échangeur Na/Ca, Cytochrome b561, DBH, H ⁺ ATPase I & II, NADH oxydoréductase, phosphatidylinositol 4-kinase; glycoprotéines II, III, fodrine, α -actinine, Protéines G0, Rab3, RhoA; synaptotagmine, synaptobrévine

Tableau 1 : Principaux constituants de la matrice des granules de sécrétion. D'après (Winkler, 1997)

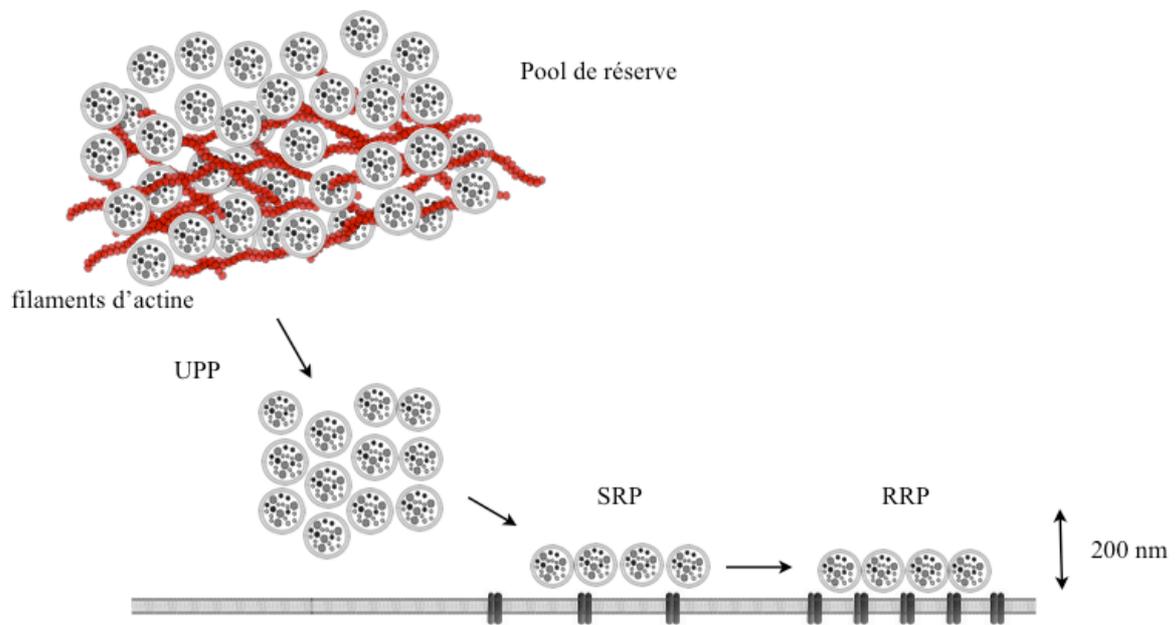


Figure 5 : Les différents pool de granules dans les cellules chromaffines.

Une stimulation importante de cette glande aboutit donc à la libération d'une grande variété de molécules actives induisant des effets physiologiques complexes. A titre d'exemple, des rôles antimicrobiens, immunomodulateurs ou analgésiques ont été démontrés (Crivellato et al., 2008). Ceci implique la nécessité d'une régulation fine de l'exocytose au niveau de ces cellules.

La membrane des granules est constituée de nombreux lipides comme le cholestérol, des phospholipides, des gangliosides, de la lysophosphatidylcholine. Elle présente également des protéines membranaires et transmembranaires (cf. tableau 1).

2- Notion de pool de granule

La répartition des granules dans le cytoplasme n'est pas uniforme. Des études de capacitance réalisées par Augustine et Neher au début des années 90 définissaient deux pools de granules : un petit pool de granule situé à proximité de la membrane plasmique, induisant une réponse rapide de l'exocytose et un deuxième pool beaucoup plus important appelé pool de réserve et responsable d'une sécrétion plus lente et plus soutenue (Augustine and Neher, 1992). Depuis, différents travaux ont permis de mettre en évidence l'implication d'autres pools granulaires (**Figure 5**) (Becherer and Rettig, 2006 ; Sørensen, 2004) :

- Le RRP (« Readily Releasable Pool ») est constitué de granules situés à la membrane plasmique, arrimés et prêts à fusionner dans un laps de temps estimé entre 20 et 40 ms après un flash calcique de 20 μ M.
- Le SRP (Slowly Releasable pool) est constitué de granules arrimés mais qui ne sont pas compétents pour la fusion, et fusionnent environ 200 ms après un flash calcique. Les expériences de capacitance réalisées par le groupe de Neher ont estimé ce pool à environ 150 granules (Moser and Neher, 1997).
- Le UPP (« Unprimed Pool ») constitue un pool de granule situé à environ 200 nm de la membrane plasmique. Dans les cellules chromaffines issues d'animaux adultes (le nombre de vésicule varie en fonction du stade de développement), il est constitué d'environ 750 granules.
- Le pool de réserve est situé au delà des 200 nm de la membrane plasmique. C'est le pool le plus important et il est séparé de la membrane plasmique par une barrière d'actine (Aunis and Bader, 1988).

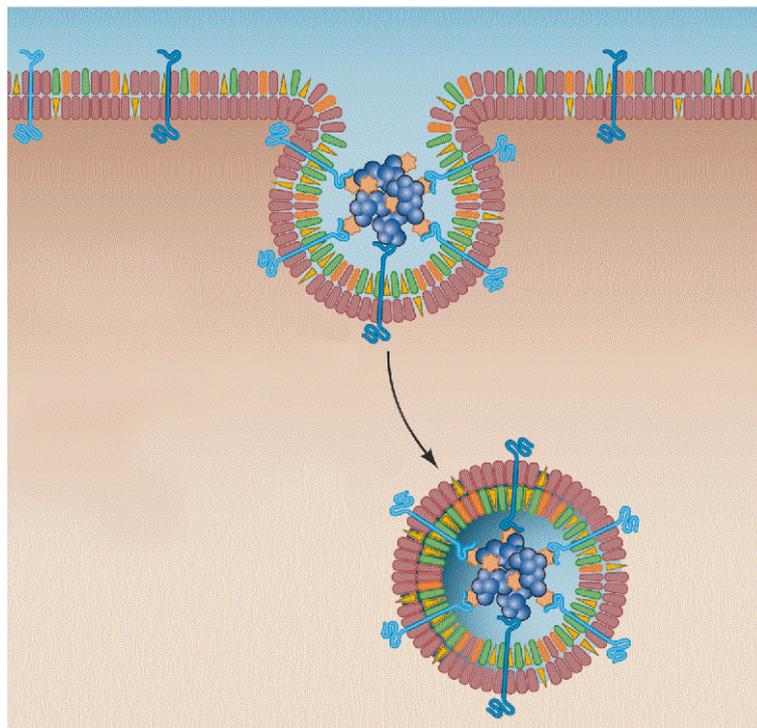
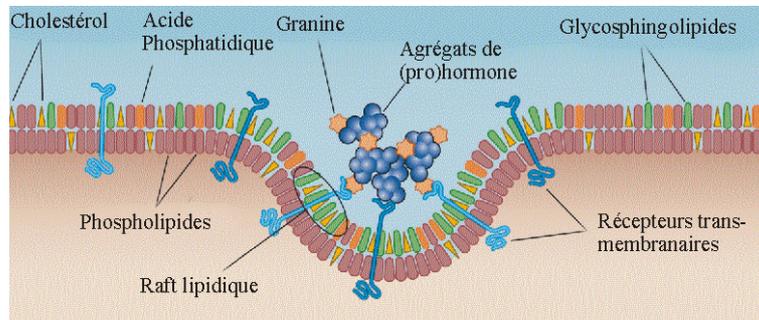


Figure 6: Biogenèse des granules à partir de la membrane de l'appareil de Golgi. La coopération entre les granines et pro-hormones et les phospholipides permet le bourgeonnement du granule immature. D'après Kim, 2006.

3- De la naissance à la formation du granule

a- Biogénèse et protéines granulogènes

Les granules de sécrétion sont formés par bourgeonnement à partir du réseau trans-Golgien (TGN). La biogénèse des granules nécessite l'intervention de lipides et de protéines. Ce processus débute par l'agrégation sélective de protéines dites granulogènes, qui sont destinées à être empaquetées dans les granules de sécrétion. Ces protéines granulogènes sont les granines, famille à laquelle appartiennent les chromogranines. Il a été démontré que leur agrégation est possible du fait de conditions chimiques particulières retrouvées dans le compartiment golgien, à savoir le pH faible et la présence de calcium (Yoo, 1995). Des souris transgéniques exprimant des ARN interférents dirigés contre la Chromagrannine A présentent une réduction du nombre de granules de sécrétion (Kim et al., 2005). Cette propriété intrinsèque d'agrégation a été confirmée récemment dans des cellules non sécrétrices. En effet, la surexpression de la Chromagrannine A dans des cellules COS-7 aboutit à la formation de vésicules mobiles et la co-transfection d'hormones peptidiques induit leur adressage dans ces vésicules (Montero-Hadjadje et al., 2009).

Au niveau de la zone d'agrégation, la membrane golgienne va bourgeonner et permettre ainsi la formation de granules immatures. La formation des bourgeons serait dépendante de la clathrine et suppose une force motrice favorisant le bourgeonnement. Cette force pourrait être générée par l'interaction entre les molécules contenues dans le granule (granines et prohormones) et les radeaux lipidiques. L'émergence du granule peut aussi être facilitée par la synthèse locale de lipides tels que le diacylglycérol et l'acide phosphatidique qui peuvent modifier la courbure des membranes (cf. page 38) (**Figure 6**) (pour revue (Kim et al., 2006)).

A ce stade, les granules formés sont immatures et contiennent des protéines de la voie constitutive et régulée. Des étapes de maturation sont maintenant requises pour aboutir à la formation de granules fonctionnels.

b- Maturation

Le processus de maturation est complexe et passe par trois étapes principales : la fusion homotypique des granules, l'élimination des protéines et des membranes non nécessaires, et l'acidification de la matrice granulaire (**Figure 7**). La première phase de la maturation présente la particularité de passer par une étape de fusion homotypique faisant intervenir la syntaxine 6 et la synaptotagmine IV et qui aboutit à des granules immatures de taille importante (Wendler et al., 2001 ; Ahras et al., 2006). Ensuite, une élimination des protéines

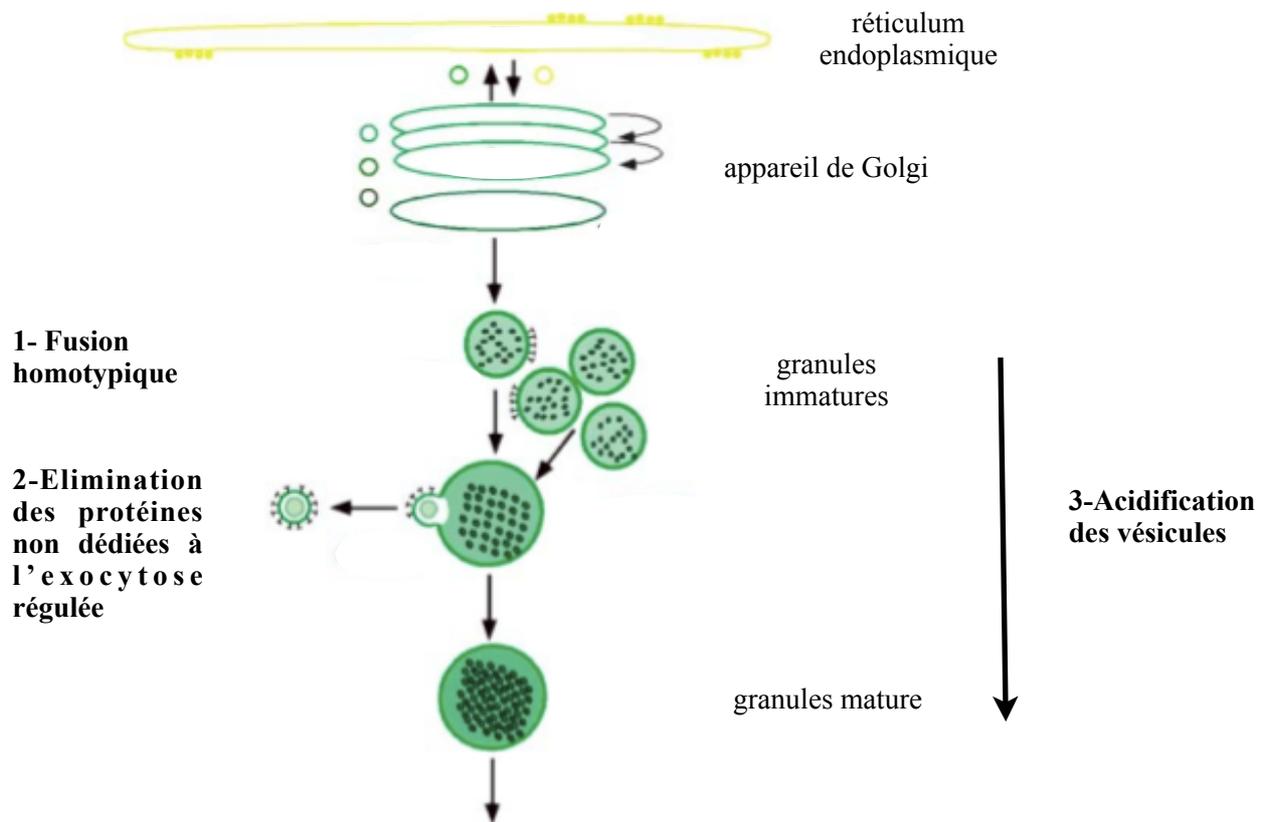


Figure 7: Les différentes étapes de maturation du granule de sécrétion.

D'après Morvan and Tooze 2008.

non dédiées à l'exocytose régulée telles que les enzymes lysosomales ou les protéines de la voie constitutive est effectuée. Ces protéines seront regroupées au sein de vésicules qui se détacheront du granule immature. Ce processus fait intervenir la clathrine et des protéines AP-1 et ARF1 (Dittie et al., 1997 ; Dittie et al., 1996).

Certaines hormones non fonctionnelles de la matrice granulaire nécessitent une activation leur permettant de passer de l'état de pro-hormone à celui d'hormone (Urbe et al., 1997). Cette étape est souvent possible grâce à l'acidification que subit la matrice granulaire. Le pH passe progressivement de 6,5 dans le compartiment golgien à 5,2 dans le granule mature grâce à l'action d'une pompe à protons (V-ATPase) (Wu et al., 2001). C'est également à ce moment-là que le granule va compléter son contenu : les catécholamines présentes dans le cytoplasme sont accumulées à l'intérieur de la matrice *via* un transporteur spécifique qui agit en antiport de la V-ATPase. Il permet ainsi d'accumuler les hormones à des concentrations relativement élevées. La synthèse de noradrénaline a lieu dans la matrice du granule grâce à la dopamine- β -hydroxylase (DBH), la noradrénaline formée va être exportée dans le cytoplasme puis modifiée par la phényl-N-méthyl-Transferase (PMNT) présente dans les cellules adrénergiques ce qui va aboutir à la formation de l'adrénaline. Cette dernière sera ensuite récupérée par le granule. Les granules vont également accumuler du calcium, du magnésium et des nucléotides. Une protéolyse importante des granines a également lieu ce qui aboutit à la formation de nombreux peptides aux fonctions biologiques variées (Hook and Metz-Boutigue, 2002).

Une fois matures, les granules vont être acheminés vers la périphérie cellulaire afin d'être rapidement mobilisable pour l'exocytose.

4- Fonction du cytosquelette dans les transport des granules jusqu'à la périphérie cellulaire

a- Les microtubules pour le transport longue distance

Les travaux de Poisner et Bernstein en 1971 ont montré que le transport des granules de sécrétion de l'appareil de Golgi vers la périphérie cellulaire est sous le contrôle des microtubules (Poisner and Bernstein, 1971). En 2003, Neco et collaborateurs ont évalué par électrophysiologie et microscopie confocale les effets de drogues touchant la dynamique des microtubules sur des cellules chromaffines (Neco et al., 2003). La déstructuration du réseau de microtubules inhibe la libération de catécholamines au cours des phases lentes de la sécrétion ainsi que lors de stimulations répétées. Elle a aussi comme conséquence de réduire

la mobilité des granules situés au niveau du cytoplasme. Ces résultats suggèrent ainsi la nécessité d'un réseau de microtubules intact pour le déplacement des granules vers la périphérie cellulaire. Une fois en périphérie, les granules de sécrétions sont piégés dans le réseau cortical d'actine.

b- Rôle de l'actine : barrière ou transport à courte distance ?

Dans des cellules chromaffines au repos, des observations en microscopie électronique ont montré que l'actine forme un réseau dense de filaments situé sous la membrane plasmique, l'épaisseur de ce réseau d'actine est estimée entre 50 et 100 nm. Il permettrait de séparer les granules de sécrétion du pool de réserve de la membrane plasmique (Nakata and Hirokawa, 1992). Différentes toxines ou molécules issues de bactéries, de champignons ou d'éponges de mer peuvent agir sur l'actine (Spector et al., 1999). Parmi ces molécules, la latrunculine, les cytochalasines et les toxines clostridiales provoquent la dépolymérisation des filaments d'actine, alors que la jasplakinolide et les phallotoxines vont plutôt stabiliser l'actine filamenteuse et figer ainsi le cytosquelette. L'utilisation de ces drogues à faible dose indique que la stabilisation de ce réseau cortical d'actine inhibe l'exocytose alors que sa dépolymérisation favorise l'activité sécrétrice (Matter et al., 1989 ; Gil et al., 2000 ; Johns et al., 2001). Ce réseau d'actine joue donc le rôle de barrière physique empêchant à la majorité des granules de réserves d'accéder à la membrane plasmique dans des conditions de repos (**Figure 5**).

Le maintien de cette barrière d'actine peut être assuré par des protéines de réticulation telles que la vinculine, la filamine ou encore la spectrine (Aunis and Bader, 1988). Nous le verrons plus loin au cours du manuscrit, des GTPases comme Go et RhoA jouent également un rôle important dans la stabilisation de cette barrière.

Il est intéressant de noter que ce réseau cortical d'actine n'est pas un réseau figé mais il est plutôt dynamique et subit au contraire des remodelages permanents (Giner et al., 2007). De la même façon, les granules de sécrétion ne sont pas immobiles et se déplacent de façon active par des mouvements nécessitant de l'ATP et dépendant du cytosquelette d'actine (Lang et al., 2000). L'idée étant que le cytosquelette d'actine puisse également servir de rail pour permettre une répartition homogène des granules de sécrétion dans cette zone corticale.

Après stimulation de l'exocytose, une forte diminution du marquage de l'actine filamenteuse par la phalloïdine est observée, traduisant ainsi une dépolymérisation du cytosquelette (Tchakarov et al., 1998 ; Aunis and Bader, 1988). La protéine scindérine, active

en présence de calcium, semble participer à cette dépolymérisation (Trifaro et al., 2000 ; Dumitrescu Pene et al., 2005). Les granules constituant le pool de réserve peuvent alors être recrutés à la membrane plasmique, au niveau des sites d'exocytoses et induire une exocytose massive (Vitale et al., 1995 ; Malacombe et al., 2006a).

Le rôle de l'actine est en réalité plus complexe. A faible doses, l'utilisation de toxines ou de drogues induisant une dépolymérisation du cytosquelette d'actine stimule l'exocytose tandis qu'un traitement à plus forte concentration aboutit à un effet inhibiteur (Matter et al., 1989 ; Gasman et al., 2004). De plus, lors d'une étude par vidéomicroscopie, une dizaine de seconde après la stimulation, les auteurs observent un remodelage du cytosquelette d'actine qui aboutit à la formation de filaments perpendiculaires à la membrane plasmique sur lesquels les granules de sécrétion se déplaceraient (Giner et al., 2005). La myosine Va pourrait être le moteur moléculaire permettant ce transport de granules. Un complexe formé de la myosine Va, de la GTPase granulaire Rab 27 et de la protéine MyRIP (Myosin- and Rab-Interacting Protein) permet de faire le lien entre le granule et les filaments d'actine. La formation de ce complexe participerait au contrôle des mouvements des granules à proximité de la membrane plasmique (Desnos et al., 2003; Rose et al., 2003). La myosine Va pourrait également intervenir plus précocement, et permettre de capturer les granules afin de les maintenir au niveau du cortex d'actine. En effet, lorsque l'activité de la myosine Va est inhibée dans des cellules PC12 au repos, les granules ne sont plus distribués en périphérie cellulaire (Rudolf et al., 2003). Cependant, il n'est pas exclu que la myosine Va ne puisse pas intervenir dans un processus plus tardif comme cela a été démontré récemment dans la lignée BON de cellules entérochromaffines (Desnos et al., 2007)

Le cytosquelette d'actine permettrait donc d'assurer à la fois une répartition correcte des granules à la périphérie cellulaire, jouerait un rôle de barrière physique maintenant les granules éloignés de la membrane plasmique, et enfin, participerait au transport de ces granules vers les sites d'exocytose après stimulation des cellules.

5- A la membrane plasmique

Une fois à la membrane plasmique, les granules de sécrétion ne vont pas fusionner directement avec celle-ci mais vont s'y lier par un processus complexe et encore mal compris. On peut décomposer ce processus en différentes étapes : l'étape d'accostage, où les vésicules se mettent en place à proximité des sites d'exocytoses, l'étape d'arrimage à la membrane

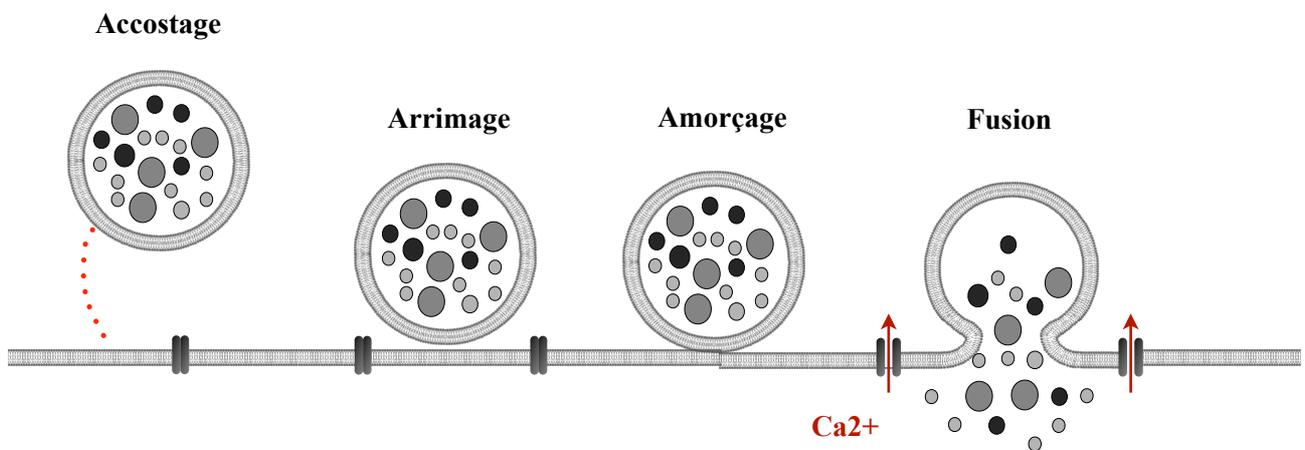


Figure 8: Les étapes terminales de l'exocytose. Le granule s'approche de la membrane plasmique. Il accoste au niveau des sites d'exocytose et s'y arrimer. Afin de pouvoir fusionner, le granule subira une dernière étape de maturation qui le rendra compétent pour la fusion.

plasmique et enfin l'étape d'amorçage permettant de rendre les vésicules compétentes pour la fusion (**Figure 8**).

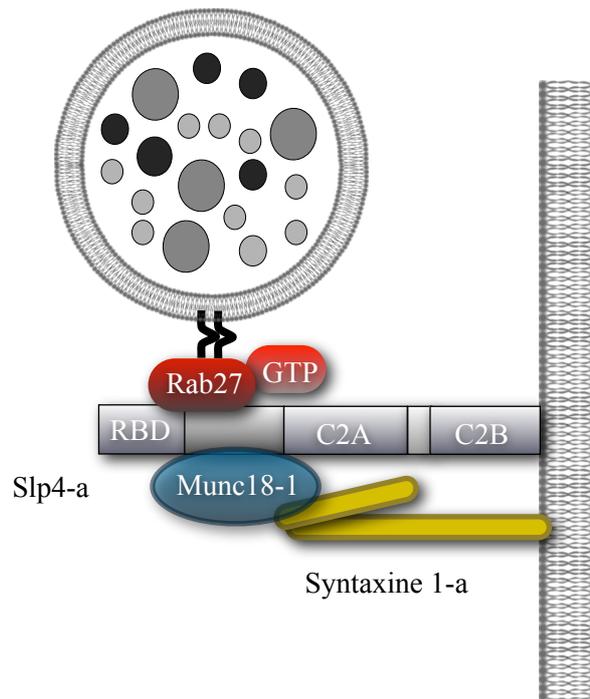
a- L'accostage

L'étape d'accostage (tethering) a pour but de diriger les granules vers les sites d'exocytose. L'une des raisons pour laquelle cette étape reste mal comprise, est que la question de l'existence ou non de « pré-sites » d'exocytose se pose encore. Lopez et collaborateurs ont récemment proposé que, dans des tranches de glandes surrénales, des domaines de protéines syntaxine 1 et SNAP25 préexistants dans la membrane plasmique définiraient les sites de fusion des granules (Lopez et al., 2007). *In situ*, ces « pré-sites » d'exocytose regrouperaient des canaux calciques, ce qui permettrait de réguler finement le processus de sécrétion. Il semble que ce soit également le cas pour les cellules chromaffines en culture où l'exocytose a lieu à proximité de regroupement de canaux calciques (Becherer et al., 2003). Dans les cellules PC12, des agrégats de syntaxine pourraient également constituer des plate-formes préférentielles pour l'arrimage des granules destinés à la sécrétion (Lang et al., 2001). Cependant, nous ne pouvons pas déterminer à ce jour si ces « pré-sites » sont responsables du recrutement du granule, ou si au contraire, ils sont formés suite à ce recrutement.

Que l'existence de ces « pré-sites » d'exocytose soit une réalité ou non, les granules ne vont pas se diriger au hasard mais ont besoin de partenaires moléculaires. A ce jour, ces partenaires n'ont pas été clairement identifiés.

Le complexe de l'exocyste a été envisagé pour assurer cette fonction. Initialement, ce complexe a été identifié chez la levure grâce à une série de mutants thermosensibles qui présentaient des défauts de sécrétion. Il est composé de six protéines Sec (Sec3p, Sec5p, Sec6p, Sec8p, Sec10p, Sec15p) et de deux sous unités additionnelles, Exo70p et Exo84p (Lipschutz and Mostov, 2002). L'ensemble des protéines étant réparties entre la membrane vésiculaire et la membrane cible, la formation de ce complexe permet l'adressage de vésicules à la membrane cible. De cette façon, ce complexe participe à divers processus cellulaires tels que l'exocytose constitutive, la croissance dendritique, la synaptogenèse ou encore dans l'établissement de la polarité cellulaire (Hsu et al., 2004). Cependant, une seule étude réalisée dans les cellules PC12 suggère son implication dans l'exocytose régulée et ce, par l'intervention de la GTPase Ral A. Cette GTPase de la super famille Ras est un régulateur connu de l'exocyste. Les auteurs montrent qu'une interaction entre RalA et Sec5 serait nécessaire à l'assemblage du complexe de l'exocyste et régulerait ainsi l'exocytose des cellules PC12 par l'intermédiaire de Sec5 (Moskalenko et al., 2002).

A



B

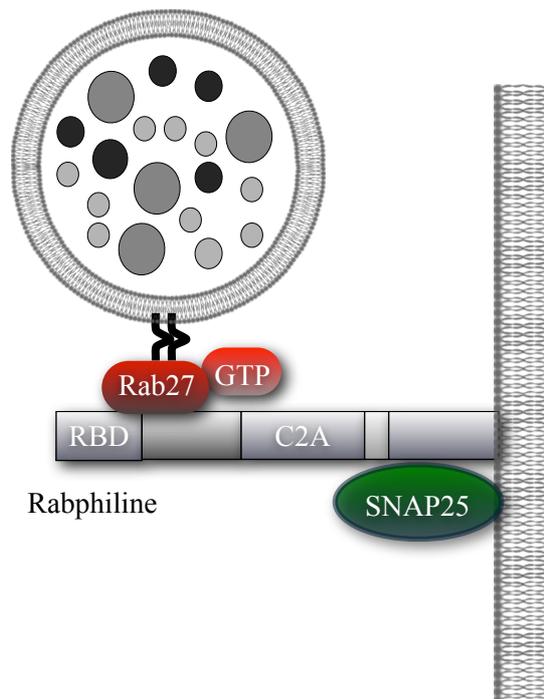


Figure 9: Deux modèles proposés par Tsuboi et collaborateurs pour le mécanisme d'arrimage des granules de sécrétion. D'après Tsuboi 2008.

Un autre candidat potentiel pour cette étape d'accostage est la GTPase monomérique Rab3A. Elle est présente sur les granules de sécrétion des cellules chromaffines et des cellules PC12 (Darchen et al., 1995). Cette protéine semble participer à la régulation des granules à proximité de la membrane plasmique. Rab3A pourrait agir par l'intermédiaire de son effecteur Rim ou sur les protéines SNARE (Darchen and Goud, 2000).

b- L'Arrimage

Il a été observé que certains granules restent moins longtemps à proximité des sites d'exocytoses (<1 sec) alors que d'autres restent en place plus de 10 sec (Toonen et al., 2006). La différence entre ces populations de granule suggère l'existence d'une structure minimale nécessaire à l'arrimage (« docking ») des granules aux sites d'exocytose.

La protéine Munc18 semble être un candidat idéal pour réguler l'arrimage des granules de sécrétion. En effet, dans des cellules chromaffines n'exprimant plus cette protéine, l'arrimage stable des granules est perturbé (Toonen et al., 2006). Munc 18 interagit avec une protéine membranaire, la syntaxine 1. Cette interaction semble primordiale au cours de cette étape car l'effet observé après inhibition de Munc-18 n'est pas restauré par la surexpression dans ces mêmes cellules d'un mutant ne liant plus la syntaxine 1 (Gulyas-Kovacs et al., 2007).

Les protéines Rabphilin et Slp4-a (synaptotagmine-like protein) pourraient également participer à cette étape. Ces deux protéines présentent un domaine de liaison en position N-terminale pour la GTPase granulaire Rab27. Deux hypothèses sont formulées par Tsuboi et collaborateurs (**Figure 9**) (Tsuboi, 2008a). La première hypothèse est la formation d'un complexe quadripartite Rab27/slp4-a/Munc18 1/Syntaxine-1a. Dans un premier temps, la protéine slp4- est recrutée par Rab27 au niveau des granules à cœur dense. Puis la protéine slp4-a interagit avec Munc18-1 avant que cette dernière n'interagisse avec la syntaxine 1. Ce complexe qui regroupe ces 4 protéines formerait un pont physique entre le granule et la membrane plasmique. L'autre modèle propose une idée relativement similaire, à la différence près que la rabphilin liée à Rab27 interagit directement à la membrane plasmique *via* une autre protéine SNARE, la SNAP25.

c- L'Amorçage

La frontière entre l'étape précédente d'arrimage et cette étape d'amorçage (priming) est relativement floue. En effet, elle est marquée par un simple changement d'interaction protéique rendant les granules compétents pour la fusion. Le processus d'amorçage définit également le transfert d'un ensemble de vésicules arrimées mais non amorcées (UPP

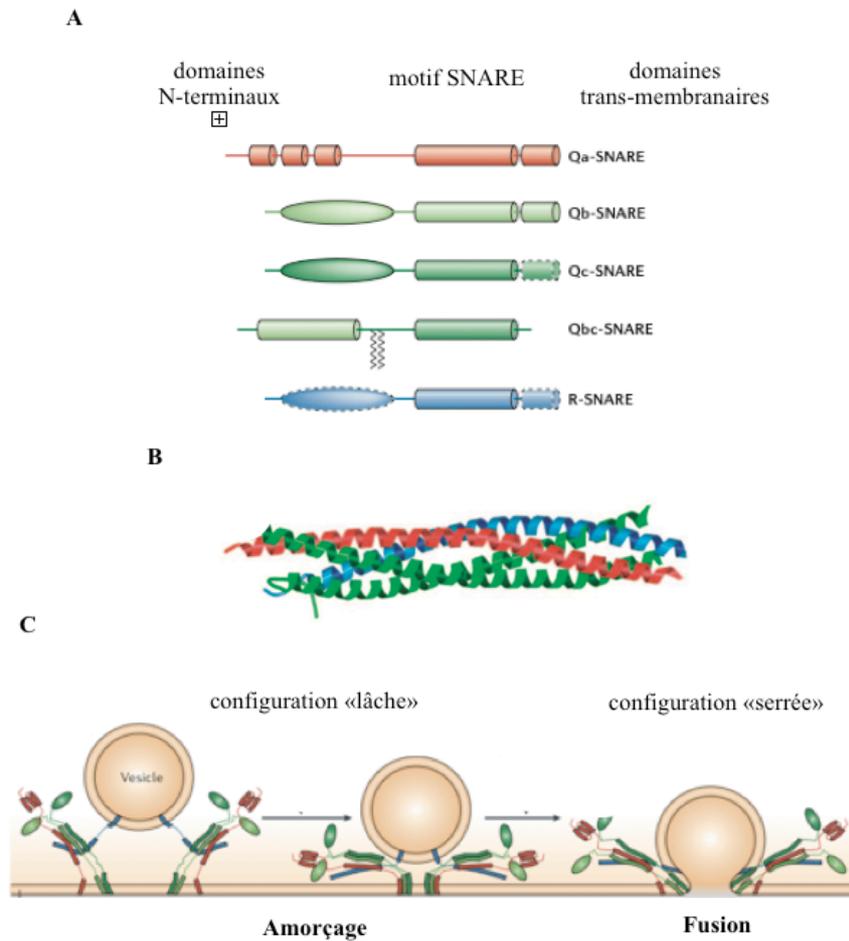


Figure 10: Le complexe SNARE. A- Les protéines du complexe présentent une organisation structurale particulière et possèdent toutes un domaine conservé appelé SNARE. B- Association des motifs SNARE des différentes protéines: VAMP2, SNAP25 et syntaxine. C- Les configurations «lâche» et «serrée» du complexe. D'après Jahn 2006.

unprimed pool) vers un pool de vésicules "libérables" (SRP ou RRP).

Le complexe SNARE, identifié dans les neurones par le groupe J. Rothman au début des années 90, est composé de trois protéines: d'une part la VAMP2/synaptobrevine, qui est vésiculaire (v-SNARE), et d'autre part la syntaxine1 et la SNAP25 (Synaptosomal Associated Protein of 25 kDa) qui sont situées sur la membrane plasmique (t-SNARE) (Söllner et al., 1993a ; Söllner et al., 1993b). Ces trois protéines présentent toutes un motif commun appelé motif SNARE, et l'association de ces motifs forme un faisceau de quatre hélices α parallèles qui constituent le cœur du complexe SNARE (**Figure 10 A,B**) (Jahn and Scheller, 2006). Ce complexe avait été proposé au départ comme un marqueur d'identité de la vésicule synaptique et de la membrane plasmique, jouant alors un rôle dans l'étape d'accostage. Il semble désormais admis que ce complexe ne soit impliqué que dans les étapes d'amorçage et de fusion, l'inhibition de la protéine SNAP-25 n'affectant pas la distribution des vésicules arrimées à la membrane. Le complexe SNARE adopte deux formes distinctes: le complexe en configuration dite « lâche » et un complexe en configuration « serrée ». Le complexe dit « lâche » est formé au cours de cette étape d'amorçage (**Figure 10 C**). Une hélice provenant de la syntaxine 1A, une de la VAMP et les deux autres de la SNAP25 sont alignées en orientation parallèle (c'est à dire toutes les extrémités N-terminales d'un côté et les extrémités C-terminales de l'autre). Ce dernier faisceau est torsadé pour former une structure en super-hélice stabilisée par 16 couches d'interactions, principalement hydrophobes. Cette configuration est considérée comme inactive pour l'exocytose.

En 1998, Weber et collaborateurs ont montré que l'incorporation de v-SNARE et de t-SNARE dans des liposomes était suffisante pour provoquer la fusion (Weber et al., 1998). Dans les cellules, les choses ne sont pas aussi simples et les différentes étapes sont finement régulées. Comme indiqué précédemment, Munc18-1 peut se lier à la syntaxine 1, et c'est cette interaction qui semble empêcher la formation du complexe SNARE. Sachant cela, il est donc nécessaire qu'une autre protéine entre en jeu afin de permettre à la syntaxine 1 d'être libérée pour pouvoir s'associer avec les autres SNARE et former le complexe.

Il existe bien d'autres protéines susceptibles d'intervenir dans les étapes d'arrimage et d'amorçage : les complexines, qui permettraient de stabiliser les complexes SNARE formés et seraient déplacées par la synaptotagmine lors du déclenchement de la fusion (Cai et al., 2008). La snapin, Rab3, la protéine RIM ou encore la tomosyne pourraient également stabiliser le complexe SNARE (Yizhar and Ashery, 2008 ; Sun et al., 2001; Tian et al., 2005). Le rôle précis de ces protéines reste encore à déterminer.

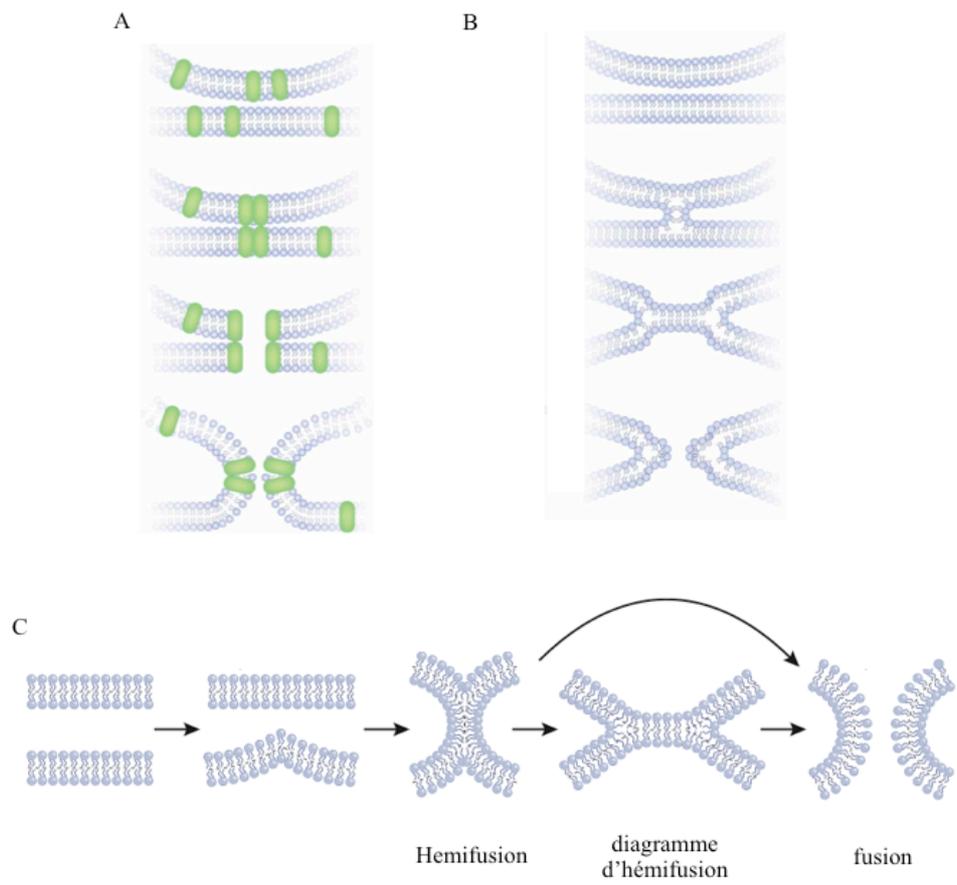


Figure 11: Le pore de fusion. A- Modèle du «pore canal» ou «pore protéique». B- Modèle du «pore lipidique». Dans le modèle du pore lipidique, l'étape d'hémifusion peut soit passer par la création d'une tige d'hémifusion, soit évoluer directement vers la fusion. D'après Jackson 2008 et Chernomordik 2008.

6- La fusion

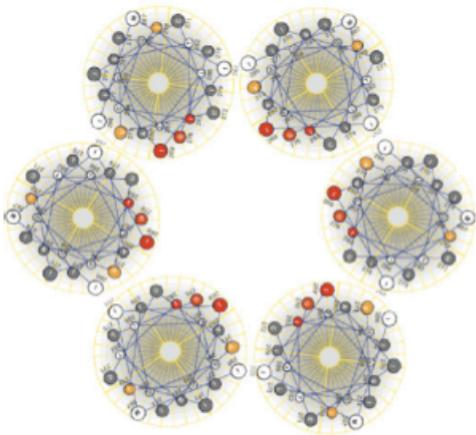
a- Le pore de fusion

La nature du pore de fusion qui se crée entre le granule de sécrétion et la membrane plasmique n'est pas clairement définie. Deux modèles s'opposent : le modèle du « pore canal » où les protéines seraient à l'origine de la création du pore de fusion et le modèle du pore lipidique où la fusion entre les membranes du granule et la membrane plasmique est nécessaire.

(i) Pore canal

Dans le modèle du « pore canal » ou « pore protéique », des protéines présentes sur la membrane des granules de sécrétions et sur la membrane plasmique s'associeraient en complexe pour former un pore relativement étroit. Ce dernier pourrait ensuite se dilater grâce au mélange des lipides et au remodelage de la bicouche lipidique (**Figure 11 A**). Ce modèle a notamment été suggéré à la suite de travaux réalisés par le groupe de Mayer. Les auteurs mettent en évidence l'implication des sous unités de la V-ATPase qui forment un tube nécessaire à la fusion des vacuoles chez la levure (Peters et al., 2001). Cette ATPase semble également jouer un rôle important au cours de la sécrétion dans les cellules β pancréatiques, l'inhibition d'une de ses sous-unité aboutissant à un défaut de sécrétion (Sun-Wada et al., 2006). Des résultats similaires ont été retrouvés avec la sous unité V0a1 de cette ATPase dans des neurones de drosophiles (Hiesinger et al., 2005). Par ailleurs, il a été proposé que le pore de fusion soit intégralement constitué des domaines transmembranaires de la syntaxine (Han and Jackson, 2006). Au cours de leur étude, Han et Jackson réalisent une série de mutations au niveau de la structure hélicoïdale de la protéine syntaxine aboutissant à une altération de la conduction du pore de fusion (**Figure 12**) (Jackson, 2007). Un pore de fusion semblable a été suggéré par des études de microscopie de force atomique (AFM) sur des cellules pancréatiques (Jena et al., 2003). La notion de porocytose, c'est à dire exocytose sans fusion des membranes a même été avancée (Silver and Pappas, 2005). L'exocytose au niveau synaptique est un événement qui peut être très rapide (de l'ordre de la milliseconde) et les auteurs avancent que les cinétiques observées ne peuvent pas expliquer la création d'un pore complet où les membranes fusionnent entre elles. Dans le modèle de Jackson, après la formation du pore, les membranes pourraient fusionner et le pore pourrait alors se dilater.

A



B

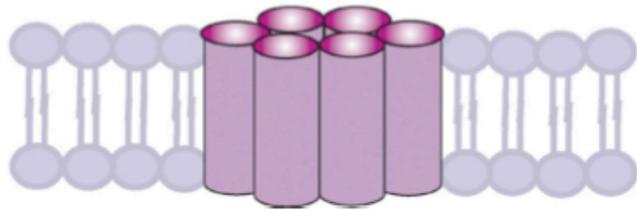


Figure 12: Modèle d'un pore de fusion protéique impliquant la syntaxine. Vue de dessus (A) et de profil (B) des six segments transmembranaires de la syntaxine 1 permettant de créer le pore de fusion protéique. D'après Jackson 2007

(ii) Pore lipidique

Le modèle du pore lipidique semble plus admis. Dans ce modèle, les deux feuilletts proximaux des membranes du granule et de la membrane plasmique vont rentrer en contact puis fusionner progressivement pour créer une tige d'hémifusion (**Figure 11 B, C**). L'hémifusion requière une déformation élastique complexe des feuilletts membranaires, incluant un repliement membranaire, l'écartement des chaînes d'hydrocarbones des molécules lipidiques ainsi que leur inclinaison au niveau de la surface membranaire (Kozlovsky et al., 2002). L'étape d'hémifusion a proprement dite n'est pas totalement comprise et pourrait se faire, soit par une expansion symétrique axiale de la tige d'hémifusion, aboutissant à un diagramme d'hémifusion, soit par une évolution directe vers le pore de fusion sans étapes intermédiaires (Chernomordik and Kozlov, 2008). Quel que soit son déroulement, cette étape nécessite une composition lipidique particulière des membranes. Des études *in vitro* ont notamment montré l'importance du ratio Phosphatidylcholine(PC)/Phosphatidyléthanolamine(PE) au cours de la fusion de vésicules (Kasson and Pande, 2007).

b- Les acteurs protéiques importants pour la fusion

Dans le modèle du pore lipidique, à la fin de l'étape d'amorçage, le complexe SNARE était en conformation « lâche » ne permettant pas la fusion. Un changement de conformation va s'opérer à la manière d'une fermeture éclair. Une fermeture progressive du complexe va se réaliser à partir des extrémités N-terminales des protéines permettant ainsi la force nécessaire pour surmonter les forces de répulsions électrostatiques afin de rapprocher les membranes puis favoriser les étapes de fusion (**Figure 10 C**) (Jahn and Scheller, 2006). Même si, *in vitro*, ce complexe semble suffisant pour réaliser la fusion entre deux membranes lipidiques (Weber et al., 1998), dans la cellule, ces derniers changements de configuration semblent être finement régulés.

Les régulateurs les mieux identifiés pour la régulation de ce complexe sont les synaptotagmines qui forment une famille composée d'une dizaine de membres. Ces protéines se trouvent sur les membranes de très nombreux compartiments cellulaires, comme les lysosomes, la membrane plasmique ou les granules de sécrétion. Les synaptotagmines possèdent deux domaines C2 (C2A et C2B) pouvant lier les lipides et le calcium, mais elles peuvent également interagir avec le complexe SNARE, les canaux calciques, la calmoduline, la protéine adaptatrice de la clathrine (AP2) (Marqueze et al., 2000). La liaison de la synaptotagmine avec le complexe SNARE ne se fait qu'en présence de calcium. Ainsi,

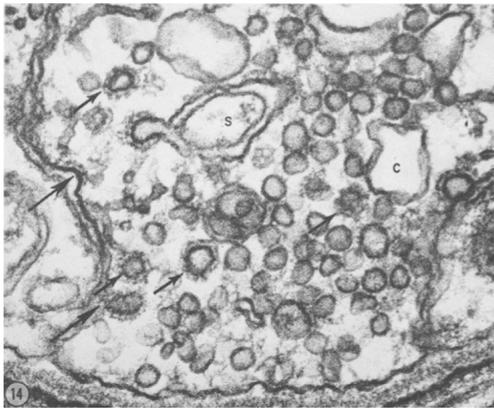
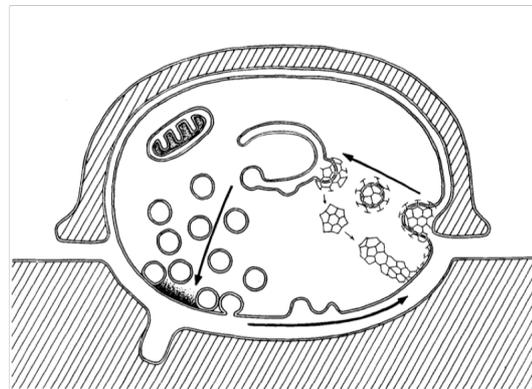
A**B**

Figure 13: Illustration du modèle d'exocytose «Full Collapse» de Heuser. A- Coupe d'une synapse de la jonction neuromusculaire de grenouille vue en microscopie électronique. Les flèches indiquent des vésicules synaptiques fusionnant à la membrane par exocytose de type «Full Collapse» et des vésicules internalisées après exocytose et présentant un manteau protéique. Les auteurs suggèrent un recyclage des vésicules par des vésicules de plus grande taille appelées «cisternes». B- Modèle d'exo-endocytose après «Full Collapse». D'après Heuser et Reese 1973.

l'influx calcique nécessaire à l'étape ultime de fusion provoquerait une liaison du domaine C2A de la synaptotagmine 1 au niveau du complexe SNARE. Ceci pourrait induire la « fermeture » du complexe SNARE et la fusion des bicouches lipidiques (Chapman, 2008).

Dans les neurones, il a été proposé un modèle dans lequel une complexine, protéine de faible poids moléculaire (15 kDa) capable de se lier au complexe SNARE, serait au contraire un inhibiteur de la fermeture du complexe qui agirait en amont de la synaptotagmine (Schaub et al., 2006). Cette protéine induirait la stabilisation du complexe SNARE au moment de l'hémifusion. Elle serait alors remplacée par la synaptotagmine après augmentation du calcium. Cependant son rôle est loin d'être bien compris dans les cellules chromaffines car elle a été, tour à tour, identifiée comme un inhibiteur de l'exocytose (Itakura et al., 1999), un régulateur de la fermeture du pore de fusion (Archer et al., 2002) ou même une protéine favorisant l'exocytose et participant à l'étape d'amorçage (Cai et al., 2008).

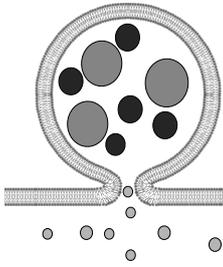
c- Les différents modes d'exocytose

Le degré de dilatation et le temps d'ouverture du pore de fusion ainsi créé va avoir une grande importance au niveau du mode d'exocytose. Il n'existe pas à proprement parlé un seul type d'exocytose et le granule semble libérer ses composants de différentes manières.

Les premières études sur le sujet ont été réalisées en 1973 sur des jonctions neuromusculaires de grenouilles par une approche de microscopie électronique. Déjà, deux modèles s'opposent : celui de Heuser et Reese et celui de Ceccarelli et collaborateurs (Heuser and Reese, 1973 ; Ceccarelli et al., 1973). Le premier défend l'hypothèse d'une exocytose de type « Full collapse ». Après une stimulation électrique de 10 Hz ils observent en microscopie électronique que le nombre de vésicules synaptiques diminue et que la surface membranaire augmente. Les vésicules semblent fusionner de façon à se fondre à la membrane plasmique. Ils observent également la formation, en dehors des zones actives, de vésicules présentant un manteau protéique qui semblent fusionner avec des grosses structures appelées « citernes ». Ces grosses vacuoles permettraient le recyclage des vésicules synaptiques (**Figure 13**) (Heuser and Reese, 1973). L'étude de Ceccarelli met en évidence ce qui sera appelé plus tard l'exocytose de type « Kiss and Run ». Après des stimulations plus faibles (2 Hz), les auteurs n'observent pas d'augmentation de la surface membranaire, détectent très peu de vésicules recouvertes d'un manteau protéique, mais en revanche, ils observent des vésicules synaptiques en contact avec la membrane plasmique *via* un petit pore (Ceccarelli et al., 1973).

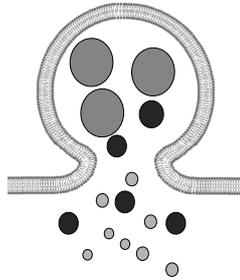
A

Kiss and Run



B

Cavicapture



C

Full Collapse

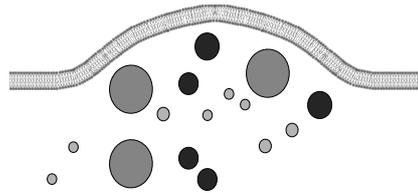


Figure 14 : Schéma représentant les trois principaux modes d'exocytose dans les cellules chromaffines.

Depuis ces deux articles majeurs, de nombreuses études ont été réalisées utilisant des approches et des modèles variés. Cependant, le débat sur l'existence ou non d'un mode d'exocytose de type « Kiss and Run » dans les cellules neuronales est toujours vif. En revanche, dans le cas des cellules chromaffines, différents modes de fusion entre le granule et la membrane plasmique semblent coexister.

L'exocytose de type « Full Collapse » est bien admise. Tout d'abord mise en évidence par des études de microscopie électronique, elle a ensuite été confirmée par des approches électrophysiologiques (Patzak and Winkler, 1986 ; Elhamdani et al., 2006b). Elle se traduit par une dilatation totale du pore de fusion aboutissant à une continuité entre de la membrane du granule et la membrane plasmique (Harata et al., 2006a ; Rizzoli and Jahn, 2007). Au cours de ce type d'exocytose, tous les constituants du granule sont libérés dans le milieu extracellulaire (**Figure 14 C**).

Des événements d'exocytose de type « Kiss and Run » ont également été mis en évidence dans les cellules chromaffines grâce à des expériences de capacitance puis confirmés par patch-ampérométrie. (Ales et al., 1999 ; Artalejo et al., 1995). Ces expériences électrophysiologiques suggèrent la possibilité d'une libération de petite quantité de catécholamines *via* un pore relativement étroit (3-4 nm) et transitoire formé entre les granules et la membrane plasmique. Ce type de pore pourrait se former dans des événements d'exocytose de type « Kiss and Run ». Le modèle du pore protéique pourrait coïncider avec ce type d'exocytose. Cependant, l'existence de ce type de pore n'a pas été démontrée dans les cellules chromaffines et l'on peut se demander si un tel pore est suffisamment large pour laisser passer les catécholamines (**Figure 14 A**).

En plus de ces deux modes d'exocytose majeur, on peut également citer la cavapture. Ce processus semble désigner une fusion entre le granule et la membrane plasmique aboutissant à la création d'un pore relativement large pour laisser passer une grande partie des neuropeptides tout en préservant la structure du granule (Perrais et al., 2004). Ce mode d'exocytose pourrait être un intermédiaire entre l'exocytose de type « Kiss and Run » et « Full Collapse » (**Figure 14 B**).

Pour résumer, il existe différents modes d'exocytose qui sont en relation directe avec la dilatation et la durée d'ouverture du pore de fusion qui s'est créé entre le granule de sécrétion et la membrane plasmique. Plus le pore de fusion est large et dilaté, plus il favorise le passage de composés de haut poids moléculaires. Au cours de l'exocytose de type « Kiss and Run », seules les catécholamines pourront être sécrétées. En revanche, l'exocytose de type « Full

« Collapse » aboutira à la libération dans le milieu extracellulaire de tous les composés présents dans le granule (**Figure 14**).

Ces différents modes d'exocytoses sont dépendants de la stimulation : une faible stimulation favorise des événements de « Kiss and Run » alors qu'une stimulation plus importante conduirait à une libération massive de molécule par « Full collapse » (Fulop et al., 2005 ; Elhamdani et al., 2006a; Fulop et al., 2005; Fulop and Smith, 2006 ; Elhamdani et al., 2006a). Ceci est corrélé avec la concentration en calcium (Llobet et al., 2008). Tout ceci à un sens d'un point de vue physiologique. Dans des conditions normales, une faible stimulation de la glande aboutirait à une exocytose de type « Kiss and Run », suffisante pour libérer une quantité basale de catécholamines. Dans une situation de stress aigu, une stimulation forte aboutissant à une exocytose massive de type « Full Collapse » permettrait la libération des tous les composés nécessaires à une réponse adéquate face à une situation de danger.

d- Les régulateurs de la dynamique du pore de fusion

Le mode d'exocytose dépend donc du temps d'ouverture et de la dilatation du pore de fusion qui eux mêmes sont dépendants de la concentration calcique. Une partie des acteurs responsables de la régulation du pore de fusion devrait donc être sensibles au calcium.

De nouveau, la synaptotagmine est considérée à l'heure actuelle comme le meilleur candidat pour assurer ce rôle. Les travaux de Wang et collaborateurs suggèrent l'implication de deux isoformes de la syntaptotagmine, l'isoforme 1 et l'isoforme 4, dans la régulation du pore de fusion. En surexprimant les formes sauvages ou mutées de la synaptotagmine 1 et 4 dans les cellules PC12, les auteurs aboutissent à la conclusion que la synaptotagmine 1 favoriserait des événements d'exocytose de type « Full collapse » et la synaptotagmine 4 favoriserait des événements de type « Kiss and Run » (Wang et al., 2003). Ces deux isoformes possèdent une sensibilité différente au calcium. Du fait de la substitution du résidu sérine en position 230 en résidu aspartate, la synaptotagmine 4 est moins sensible au calcium sur le domaine CA2 (von Poser et al., 1997). Etant donné que les modes d'exocytose ne se déroulent pas dans les mêmes concentrations calciques, cette différence de sensibilité calcique pourrait être à l'origine de l'intervention de l'une ou l'autre des isoformes. Cependant le mécanisme moléculaire n'est pas connu.

L'actine pourrait jouer un rôle de régulation du pore de fusion. Les travaux du groupe de M. Lindau montrent que l'inhibition de la polymérisation de l'actine induit une augmentation de la durée de l'ouverture du pore de fusion suggérant ainsi un rôle de l'actine

dans l'expansion du pore de fusion (Berberian et al., 2009). Les auteurs proposent qu'une polymérisation de filaments d'actine permettrait d'exercer des forces de tensions aboutissant à une expansion du pore de fusion. Ces données pourraient expliquer les résultats obtenus au laboratoire par Stéphane Gasman suggérant que les filaments d'actine, induit par Cdc42 au cours des phases tardives de l'exocytose, augmente la sécrétion dans les cellules PC12. Le groupe de Bement suggère un rôle de l'actine dans un phénomène intitulé « Kiss and Coat ». Selon les auteurs, il s'agirait d'un mode d'exocytose intermédiaire entre le « Kiss and Run » et le « Full Collapse » où l'actine participerait au maintien de la structure du granule tout en permettant un temps d'ouverture plus long du pore de fusion (Sokac and Bement, 2006). Cependant, ces expériences ont été réalisées dans un système bien particulier, les ovocytes de xénope, les granules de sécrétion sont de grosses structures de quelques μM de diamètre. Il est donc difficile d'extrapoler ces résultats aux granules de sécrétion de cellules chromaffines.

Enfin, on peut citer la protéine kinase C (PKC) comme autre candidat dans la régulation du mode de fusion. En stimulant la PKC par des activateurs chimiques, l'équipe de Corey Smith, observe préférentiellement une exocytose de type « Full collapse ». L'activité de la PKC étant sensible au calcium, les auteurs en déduisent que cette enzyme n'est activée que lors d'événements de type « Full collapse » au cours desquels la concentration de calcium libre est plus élevée (Fulop and Smith, 2006). Une des cibles potentielles de la PKC pourrait être la myosin II. En effet, la myosin II pourrait réguler l'extension du pore de fusion et ce rôle semble être dépendant de son état de phosphorylation (Neco et al., 2008). Cependant, cette hypothèse n'a pas été testée expérimentalement

7- Le désassemblage du complexe SNARE

A la fin du processus de fusion, les différentes protéines t- et v-SNARE se retrouvent sur la même membrane : elles forment un complexe en *cis*. Ce complexe doit être désassemblé et ceci nécessite une énergie considérable fournie par l'hexamère NSF (N-ethylmaleimide-Sensitive Factor). Cependant, NSF ne se lie pas directement au complexe SNARE et requiert un cofacteur, la protéine α SNAP (Soluble NSF Attachment Proteins) qui se lie à la surface du complexe SNARE (Jahn et al., 2003). La liaison d' α SNAP permet le recrutement puis l'activation de NSF qui va dissocier le complexe SNARE *cis* (Malsam et al., 2008). Cette dissociation est nécessaire à la réactivation des SNARE qui sont ainsi réutilisables pour un nouveau cycle de fusion.

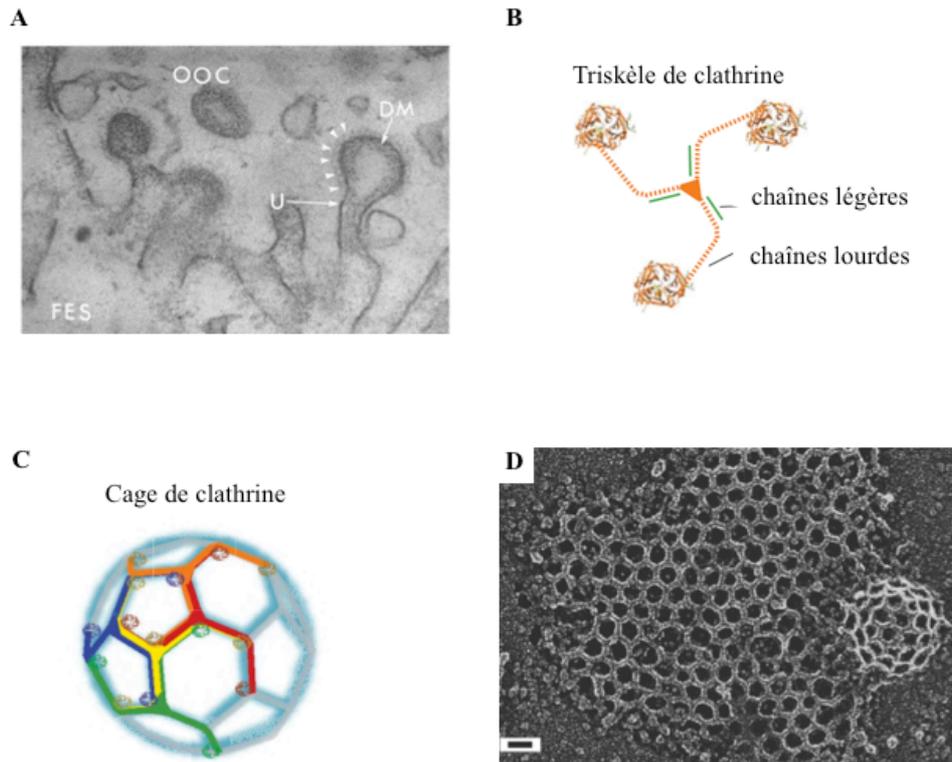


Figure 15 : La clathrine. A- Coupe en microscopie électronique d'un ovocytes de xénope présentant des invaginations membranaires recouvertes de matériel dense aux électrons (OOC: «oocyte», FES: «Interface between oocyte and follicular epithelium», DM:»Dense materiel»). Les triskèles de clathrine (B) s'associent entre eux pour former une cage de clathrine qui va englober la vésicule à internaliser. C- Cage de clathrine vue par microscopie électronique à fort grossissement. D'après Roth and Porter, 1964, Schmid and McMahon, 2007 et Mousavi, Malerod et al. 2004.

II- L'endocytose compensatrice

Dans l'ensemble des cellules sécrétrices, l'exocytose doit être suivie d'un processus d'endocytose compensatrice. Cette endocytose compensatrice est indispensable pour préserver une surface cellulaire constante et permet de recycler les composés du granule et ainsi assurer une sécrétion pérenne au cours du temps. L'importance de ce phénomène a été illustrée au cours d'une étude sur la jonction musculaire de langouste en 1970. Avec une stimulation de 20 Hz, Bittner et Kennedy ont calculé qu'en absence d'endocytose compensatrice, la fusion de chaque vésicule synaptique entraînerait une croissance de 77 à 154 cm de longueur d'axone par heure, ce qui serait catastrophique pour la cellule (Bittner and Kennedy, 1970). Dans les neurones, le recyclage des vésicules synaptiques est intensivement étudié. En revanche les mécanismes moléculaires gouvernant l'endocytose compensatrice dans les cellules neuroendocrines sont très peu étudiés et donc, restent peu connus à l'heure actuelle.

Je vais débiter cette partie par une brève introduction des différentes voies d'endocytoses connues dans la cellule. J'aborderai ensuite la question spécifique de l'endocytose compensatrice dans les cellules chromaffines.

A- Les différents voies d'endocytose mises en évidence dans la cellule

Les différentes voies d'endocytoses connues sont généralement répertoriées en fonction de leur dépendance à certaines protéines comme la clathrine, la cavéoline ou la dynamine.

1- Endocytose dépendante de la clathrine

Ce mode d'endocytose a été suggéré en 1964 par Roth et Porter (Roth and Porter, 1964). Par microscopie électronique, les auteurs ont observé tout au long de la membrane plasmique d'ovocyte de moustique, des invaginations membranaires recouvertes de matériel dense aux électrons appelées « manteau » (**Figure 15 A**). Ils en ont déduit qu'il pouvait s'agir de vésicules en train d'être internalisées. Depuis, un important travail a été réalisé afin de mettre en évidence les mécanismes moléculaires de cette voie d'endocytose : de nombreux partenaires protéiques et lipidiques ont été identifiés (Perrais and Merrifield, 2005).

Ces manteaux denses aux électrons, sont des puits recouverts de clathrine. La clathrine

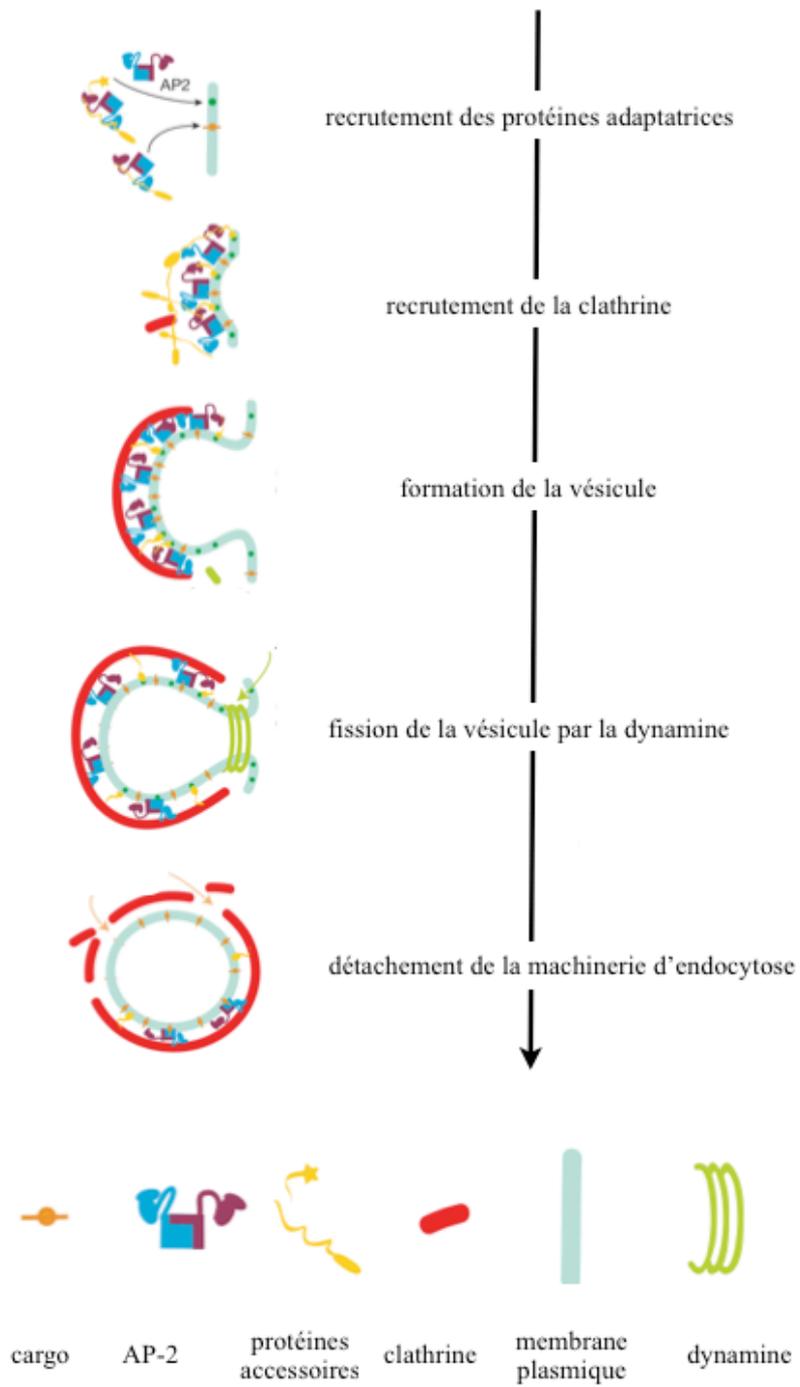


Figure 16. Illustration des différentes étapes de l'endocytose dépendante de la clathrine. D'après Schmid and McMahon 2007.

est constituée de 3 chaînes lourdes et 3 chaînes légères qui s'associent par leur domaine C-terminal pour former un « triskèle » (**Figure 15 B**). L'assemblage des triskèles va aboutir à la formation d'une cage de clathrine englobant la vésicule à internaliser. A fort grossissement, cette architecture symétrique peut être visualisée en microscopie électronique (**Figure 15 C et D**).

Les complexes adaptateurs vont faire le lien entre la clathrine et les protéines cargo à internaliser. Différents complexes existent en fonction du compartiment cellulaire. Au niveau de la membrane plasmique, c'est le complexe AP-2 qui intervient classiquement. Ce complexe protéique est constitué de 4 sous unités (α 2, β 2, μ 2 et δ 2). Le complexe AP-2 possède des sites de liaison à la clathrine (Owen et al., 2000), aux phosphoinositides (Rohde et al., 2002) ainsi qu'à des protéines accessoires. Ce complexe va assurer la reconnaissance des protéines cargo à internaliser grâce à leurs motifs tyrosines et des motifs di-leucines. Les différentes sous unités de ce complexe vont d'une part reconnaître le site d'endocytose et d'autre part permettre le recrutement de la clathrine (**Figure 16**).

A ces deux éléments fondateurs, peuvent s'ajouter des protéines auxiliaires dont la nature peut varier en fonction du cargo, du type cellulaire, ou encore de la stimulation. A titre d'exemple, on peut citer l'Eps15, l'amphiphysin, l'endophiline, la synaptojanin ou encore l'intersectine (pour revue (Mousavi et al., 2004)).

L'endophiline et l'amphiphysine possèdent des domaines BAR (Bin/amphiphysin/Rvs) qui vont favoriser les courbures de membranes (Owen et al., 2004). L'endophiline va se lier à la synaptojanin et permettre la modification de la composition lipidique de la membrane. L'amphiphysine va notamment permettre de recruter la GTPase dynamine. L'intersectine jouerait un rôle d'échafaudage et permettrait de stabiliser la machinerie d'endocytose (Hussain et al., 1999).

Une fois la vésicule d'endocytose formée, elle va se détacher de la membrane plasmique par un mécanisme de « fission ». Les GTPases dynamine sont essentielles au cours de cette étape. Ces GTPases d'environ 100 kDa sont codées par trois gènes différents. La dynamine 1 est spécifique des neurones, la dynamine 2 est ubiquitaire tandis que la dynamine 3 est exprimée dans le cerveau et les testicules (Praefcke and McMahon, 2004). On dénombre plus de 20 isoformes différentes issues d'épissages alternatifs. La dynamine est considérée comme une mécanoenzyme. Dans un premier modèle, la protéine s'oligomériserait au niveau du « cou » de la vésicule de clathrine et permettrait la fermeture et le détachement de la vésicule de la



Figure 17: Domaines de la dynamine. La dynamine possède un domaine aminocatalytique (GTPase) (rouge), un domaine central (marron), un domaine PH (pleckstrin homology) (jaune), un domaine effecteur GTPase (GED) (vert) et un domaine riche en proline (PRD) (marron).

membrane plasmique (Danino and Hinshaw, 2001). Cependant son rôle exact et son fonctionnement dans les phénomènes de fission est encore mal compris (Pucadyil and Schmid, 2008 ; Roux et al., 2006). Cette protéine peut également jouer le rôle de régulateur et permettre le recrutement de partenaires de l'endocytose (Damke et al., 2001a). Structuellement, la dynamine est organisée en différents domaines (**Figure 17**). Cette enzyme intervient également dans certaines voies d'endocytose indépendantes de la clathrine.

Enfin, l'actine a aussi été impliquée dans l'endocytose dépendante de la clathrine (da Costa et al., 2003). Dans les fibroblastes, une synthèse de filaments d'actine a été observée au niveau des puits recouverts de clathrine lors de l'endocytose selon un processus qui impliquerait N-WASP et Arp2/3 (Merrifield et al., 2004 ; Merrifield et al., 2005). L'actine pourrait jouer un rôle dans les étapes tardives de l'endocytose, juste avant la fermeture de la vésicule (Engqvist-Goldstein and Drubin, 2003; Lamaze et al., 1997).

Cette voie d'endocytose a initialement été présentée comme la seule voie d'endocytose de la cellule (Doxsey et al., 1987). Depuis, de nombreux travaux ont mis en évidence d'autres voies d'endocytose au cours desquelles la clathrine n'intervient pas.

2- Les autres voies d'endocytoses

En dehors de la voie d'endocytose « classique » dépendante de la clathrine, il existe d'autres voies qui permettent l'internalisation de différents cargos. Le choix de la voie d'endocytose va dépendre entre autre de la nature et de la taille de l'élément à internaliser (**Figure 18**). En dehors de la phagocytose qui est un cas particulier, les principales voies d'endocytose indépendantes de la clathrine sont indiquées dans le tableau 2.

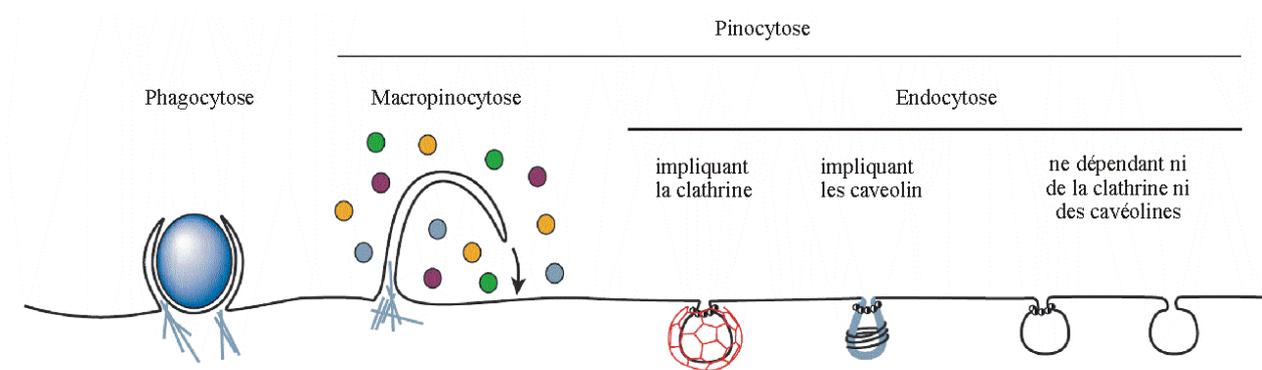


Figure 18 : Les principales voies d'endocytose dans la cellule. D'après Conner et Schmid 2003.

Voie d'endocytose	Caractéristiques	Principaux partenaires intervenants
Macropinocytose	Création de larges vésicules (> 500 nm), internalisation de gros volumes de liquides	Rac1, Arp2/3, WAVE, Ras, Src, PI3Kinase, actine (Gao et al., 2007) (Yarar et al., 2007)
Voie dépendante des cavéoles	vésicules formées sont de petites tailles, entre 50 et 100 nm	cavéoline, rafts, dynamine, PKC, Rab5, actine (Parkar et al., 2008) (Conner and Schmid, 2003)
Voie indépendante des cavéoles, dépendante de la dynamine	récepteur à l'interleukine	Dynamine, RhoA, rafts (Lamaze et al., 2001)
Voie indépendante des cavéoles, indépendante de la dynamine	complexe majeur d'histocompatibilité, des E-cadherine ou β 1 Intégrin	ARF6, PIK3 ou Rab11, rafts (Sandvig et al., 2008) (Mayor and Pagano, 2007).
	protéine à ancre GPI	Cdc42 (Sabharanjak et al., 2002)

Tableau 2 : Les principales voies d'endocytose indépendante de la clathrine

3- Une réalité plus complexe ?

Contrairement au schéma présenté Figure 18, la distinction entre les différentes voies d'endocytoses n'est actuellement pas si nette et des exceptions sont observées par rapport aux modèles classiquement proposés. Par exemple, des cellules Hela exprimant des ARN interférents dirigés contre AP-2 sont encore capables d'effectuer une endocytose du récepteur au LDL dépendante de la clathrine (Motley et al., 2003). Il ne semble pas exister d'endocytose dépendante de la clathrine universelle et les acteurs impliqués semblent varier en fonction du type cellulaire mais également de la taille de la vésicule d'endocytose à créer. (Benmerah and Lamaze, 2007). Cette complexité est bien illustrée dans la revue de Schmid McMahon en 2007 dans laquelle ils abordent la notion d'interactome des protéines impliquées dans la voie d'endocytose dépendante de la clathrine (Schmid and McMahon, 2007). En effet, pour chaque étape, les trois partenaires principaux, la clathrine, AP-2 et la dynamine, peuvent interagir avec une multitude de partenaires, rendant alors le processus beaucoup plus complexe à étudier. Il en est de même pour les voies d'endocytose indépendantes de la

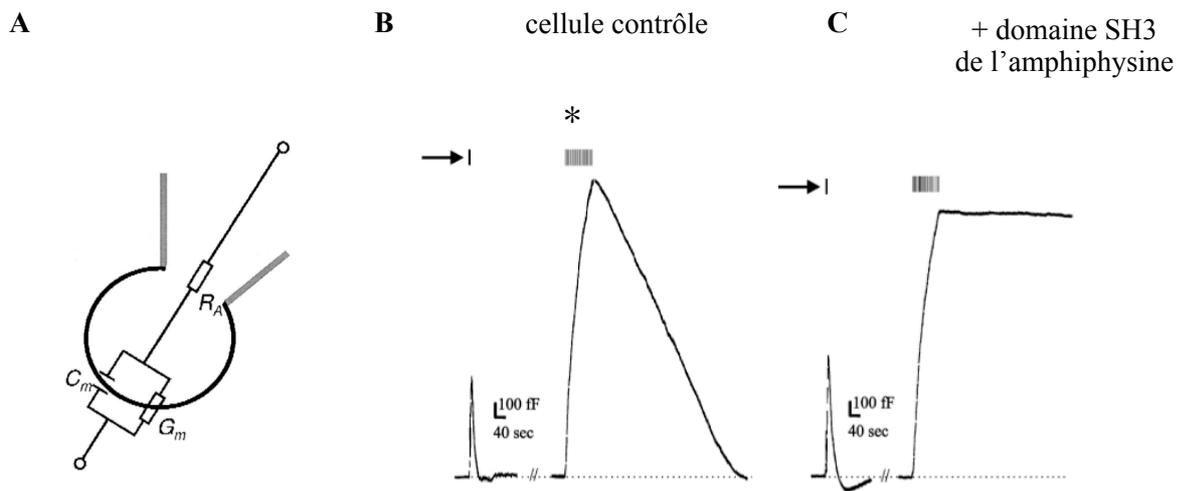


Figure 19 : Illustration d'expériences de capacitance sur des cellules chromaffines. A- Expérience de capacitance en configuration cellule entière. Dans cette configuration, le milieu de la pipette est en continuité avec le milieu intracellulaire. De cette façon, l'ajout d'anticorps ou de domaines peptidiques dans la pipette permet de perturber les activités et/ou les interactions des protéines. B- L'augmentation de la capacitance membranaire enregistrée après une importante stimulation de la cellule (*) traduit une exocytose des granules de sécrétion, la diminution de la capacitance reflète une endocytose. C- Cette endocytose est inhibée suite à l'ajout dans la pipette de domaine SH3 de l'amphiphysine. Adapté de Lollike and Lindau, 1999 et Elhamdani, Azizi et al. 2006.

clathrine. La composition en phospholipide de la membrane semble influencer le mode d'endocytose. (Spilsberg et al., 2007)

Enfin, le mode de stimulation d'un récepteur peut influencer la voie d'endocytose. C'est le cas pour l'internalisation du récepteur à l'EGF. Lorsque ce dernier est peu stimulé par son ligand, il est internalisé selon une voie dépendante des cavéoles, en revanche, après une forte stimulation à l'EGF, le récepteur est ubiquitinylé et subit une endocytose faisant intervenir la clathrine (Sigismund et al., 2005).

La cellule utiliserait donc une endocytose « à la carte », flexible et permettant un haut niveau de régulation pour s'adapter au mieux aux besoins physiologiques.

B- Les mécanismes moléculaires de l'endocytose compensatrice dans les cellules chromaffines

Le processus d'endocytose compensatrice le mieux documentée aujourd'hui est le recyclage des vésicules synaptiques (Galli and Haucke, 2004). Que connaît-on des mécanismes qui régulent ce type d'endocytose dans les cellules neuroendocrines ? A vrai dire pas grand chose. La plupart de nos connaissances à ce sujet proviennent d'expériences électrophysiologiques basées sur la mesure de la capacitance membranaire (**Figure 19**). Cette technique repose sur le principe physique suivant : la capacité électrique d'une membrane est proportionnelle à sa surface. De ce fait, tous les processus impliquant un apport ou un retrait de membrane vont faire varier la surface de la cellule et vont être quantifiables.

Les quelques études réalisées sur ce sujet se rejoignent toutes sur un point : les mécanismes moléculaires impliqués au cours de l'exocytose et de l'endocytose compensatrice sont intimement liés. On distingue une endocytose ayant lieu après une exocytose de type « Kiss and Run » (ou cavitapture) d'une endocytose ayant lieu après « Full Collapse ». Au cours des paragraphes suivants, je vais vous présenter ces deux principaux modes d'endocytose compensatrice en me cantonnant aux différentes protéines impliquées. Les questions du devenir du granule après l'exocytose, de son intégrité au cours de l'endocytose où bien la notion du couplage spatial exo-endocytose seront abordées au cours de la discussion des résultats de la deuxième étude (cf. page 77 et 75).

1- Endocytose après « Kiss and Run »

Lors du « Kiss and Run », le granule préserve sa forme et ne fusionne avec la membrane plasmique qu'au travers d'un pore relativement étroit (**Figure 14**). Les travaux du groupe de C. Artalejo montrent par mesure de capacitance que l'endocytose suivant ce mécanisme est rapide (environ 40 sec), indépendante de la clathrine et dépendante de la dynamine 1 (Artalejo et al., 1995 ; Artalejo et al., 1997 ; Elhamdani et al., 2006a). L'absence d'implication de la clathrine ne paraît pas surprenante puisque lors de ce type d'exocytose, le granule préserve sa forme et n'a donc pas besoin de former des vésicules d'endocytose. Ces données sont actuellement bien admises et ont été confirmées par d'autres groupes (Chan and Smith, 2003; Llobet et al., 2008).

Ce mode d'endocytose reste encore peu connu et les mécanismes qui permettent de recruter la dynamine 1 sont à définir. Cette endocytose doit être effectuée dans un laps de temps très court et l'on peut supposer qu'elle ne nécessite pas le recrutement de nombreux partenaires.

2- Endocytose après « Full Collapse »

Avec la même approche expérimentale, le groupe d'Artalejo suggère l'implication de la clathrine au cours de l'endocytose compensatrice faisant suite à une exocytose de type « Full collapse » (Artalejo et al., 2002a). Là encore, ce mode d'endocytose semble cohérent. En effet, lors d'une fusion de type « Full Collapse », la membrane du granule s'intègre à la membrane plasmique et sa forme n'est pas préservée ; d'où l'utilisation du terme « collapse ». Une machinerie d'endocytose plus complexe doit donc se mettre en place afin de recycler les composants du granule. De plus, le mécanisme est relativement lent puisqu'il a été estimé que la cellule retrouve sa surface membranaire de base seulement 10 ou 11 minutes après la stimulation (Elhamdani et al., 2006a). Pour effectuer une telle endocytose, une machinerie dépendante la clathrine, paraît bien appropriée.

Là encore, la dynamine semble impliquée dans ce processus, mais contrairement à l'endocytose après « Kiss and Run », il s'agirait plutôt de l'isoforme 2 (Artalejo et al., 2002b). Cette protéine est exprimée plus abondamment dans les cellules chromaffine que l'isoforme 1. De plus, une étude réalisée au laboratoire met en évidence la présence de la dynamine 2 à la membrane des granules de sécrétion (Galas et al., 2000). Ainsi, la dynamine 2 serait déjà présente pour le processus de fission et n'aurait pas besoin d'être recrutée.

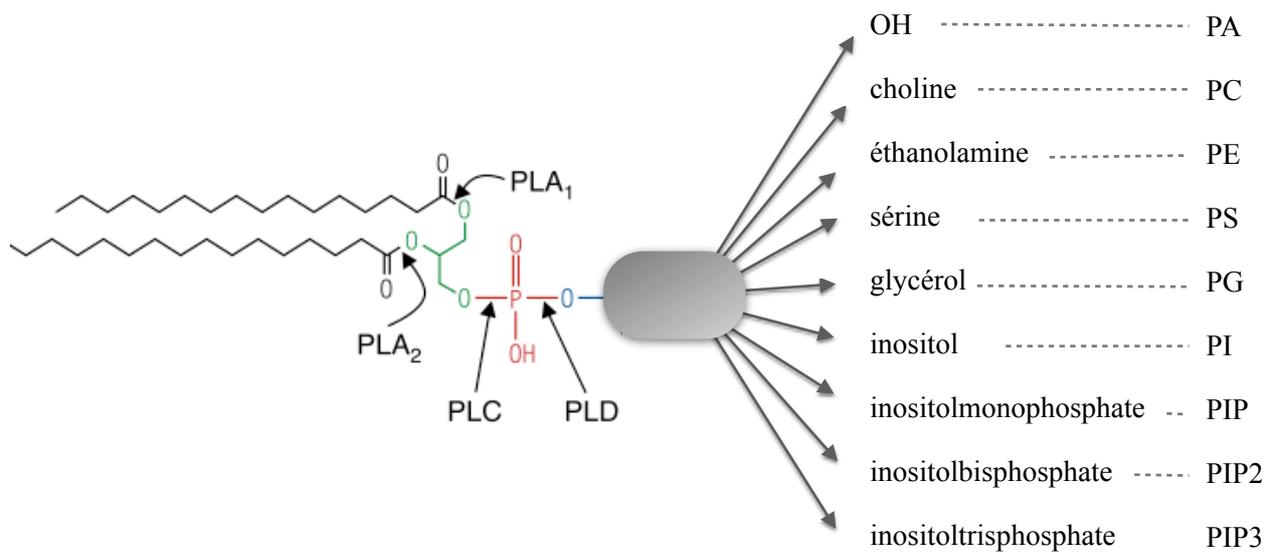


Figure 20: Nomenclature des glycérophospholipides. La partie hydrophobe est variable et va déterminer le type de glycérophospholipide . Les phospholipides présentent différents sites de clivages par des enzymes phospholipases A, C ou D. D'après Ivanova, Milne et al. 2004.

Enfin, les travaux de Elhamdani et collaborateurs ont cherché à déterminer quels pouvaient être les partenaires moléculaires de la dynamine 2. Pour cela, ils ont injecté dans le cytoplasme des cellules chromaffines des domaines SH3 de différents facteurs interagissant avec la dynamine 2 (amphyphisine, l'endophiline, Grb2 ou l'intersectine) afin de bloquer l'interaction endogène. Les mesures de capacitance dans ces cellules injectées suggèrent que l'amphyphisine, l'intersectine et l'endophiline sont impliquées dans ce type d'endocytose (Elhamdani et al., 2006b).

III- Importance des lipides dans les mécanismes d'exo-endocytose

A- La membrane plasmique et son environnement lipidique

Les membranes biologiques sont formées d'un assemblage de molécules lipidiques organisé en double feuillet qui constitue une barrière physique séparant la cellule du milieu extracellulaire et délimite le cytoplasme et les 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). Depuis, ce concept a beaucoup évolué et les membranes, particulièrement la membrane plasmique, présentent une composition et un mode d'organisation complexe. Je vais tout d'abord vous présenter la composition de la membrane plasmique puis aborder la notion des rafts ou radeaux lipidiques, microdomaines spécifiques présents au sein de cette membrane.

1- La membrane plasmique et son environnement biologique

La membrane plasmique est composée principalement de glycérophospholipides et de sphingolipides. Les principaux glycérophospholipides sont la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylinositol (PI). Ces lipides sont constitués d'un groupement glycérol estérifié en position sn-1 et sn-2 par deux chaînes d'acide gras, ce qui constitue la partie hydrophobe. Le groupe qui constitue la partie hydrophile est lié au glycérol en position sn-3 *via* un pont phosphodiester. Ce groupe est spécifique du type de glycérophospholipide (**Figure 20**). Les liens esters en position 1 peuvent être remplacés par des liaisons de type vinyl esters ou des esters saturés. Ces

glycérophospholipides vont être métabolisés pour créer notamment de l'acide phosphatidique (PA), du diacylglycérol ou des polyphosphoinositides (van Meer et al., 2008).

Les sphingolipides possèdent la céramide comme constituant hydrophobique. Ils sont représentés majoritairement par la sphingomyéline (SM) et les glycosphingolipides (GSL). Ils contiennent des mono-, di- ou oligosaccharides basés en général sur la glucosylcéramide et quelques fois sur la galactocéramide (van Meer et al., 2008).

La membrane plasmique est naturellement asymétrique. En effet, dans les cellules eucaryotes, les PS et PE sont principalement exposés sur le feuillet cytosolique, alors que la PC et la sphingomyéline sont majoritairement situés sur le feuillet externe. Concernant les lipides minoritaires, les PIs et le PA sont présents sur le feuillet interne à l'inverse des glycosphingolipides localisés sur le feuillet externe (Devaux and Morris; Pomorski et al., 1994). La modification de cette répartition asymétrique est indispensable à différents processus cellulaires comme l'activation enzymatique, la fusion membranaire, la coagulation sanguine, l'apoptose ou l'interaction de protéines (Sahu et al., 2007). Nous le verrons au cours du chapitre 3, une modification de la répartition des lipides, *via* l'action de transporteurs lipidiques, est impliquée au cours de mécanismes de trafic membranaire.

Le métabolisme des lipides est complexe et aboutit à la formation de composés qui vont soit rester dans les membranes (ex : acide phosphatidique (PA), diacylglycérol (Ligeti et al.)) soit être libérés des membranes. Les lipides produits à la membrane peuvent aboutir à la formation de courbure de membrane ou permettre le recrutement de partenaires protéiques. Les lipides libérés dans le cytoplasme vont agir comme des seconds messagers.

A l'heure actuelle, les membranes, et notamment la membrane plasmique, ne sont plus seulement perçues comme des barrières permettant la séparation entre deux milieux mais également comme une plateforme signalétique. Les lipides participent à la régulation et au contrôle des processus cellulaires. A l'instar de la protéomique, on parle désormais de « lipidomique » et de récentes études en spectrométrie de masse adaptée au lipides a pu mettre en évidence plus de 400 espèces de phospholipides (Ivanova et al., 2004).

2- Les rafts

Les rafts où microdomaines lipidiques ont été récemment définis comme « des petits domaines (10-200 nm), hétérogènes, hautement dynamiques, enrichis en stérols et en sphingolipides, qui compartimentent les processus cellulaires. Ces rafts peuvent s'agréger

Microdomaine lipidique

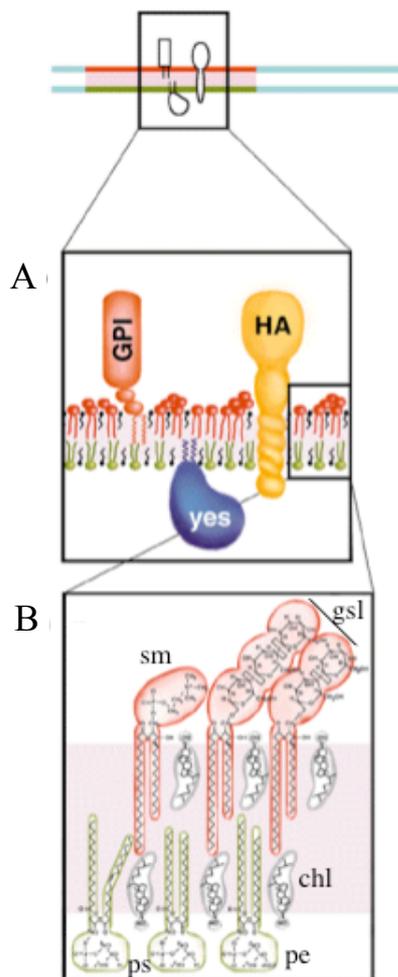


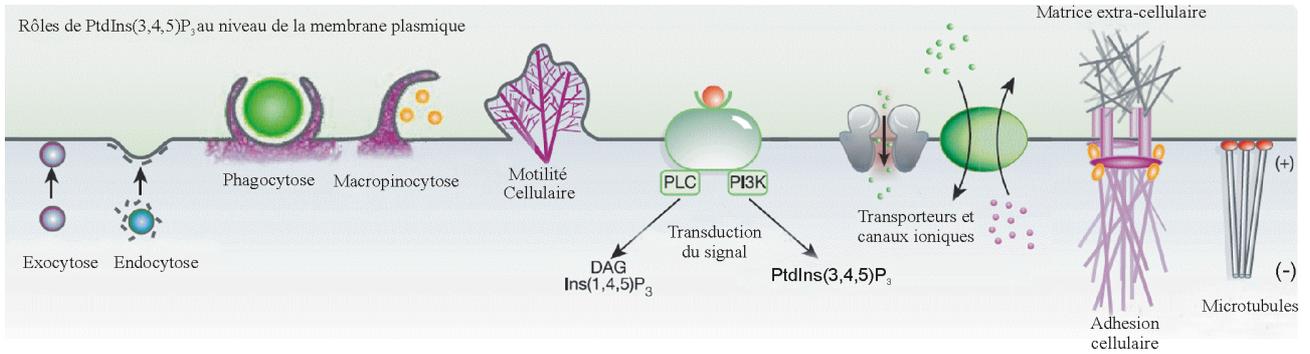
Figure 21 : Structure de radeaux lipidiques. Les microdomaines lipidiques sont des plate-formes de composition et d'organisation différentes ségréguées dans la bicouche lipidique. A-Les microdomaines lipidiques peuvent regrouper certains constituants protéiques tels que les protéines à ancre GPI, certaines protéines transmembranaires (ici l'hémagglutinine du virus influenza), ou des protéines portant des myristoylations ou des palmitoylations (comme la protéine kinase Yes de la famille Src). B- La bicouche des microdomaines lipidiques est asymétrique, avec le feuillet exoplasmique enrichi en sphingomyéline (sm) et en glycosphingolipides (gsl), et le feuillet interne enrichi en phosphatidylsérine (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).

pour former des plateformes plus larges grâce à des interactions protéines-protéines et protéines-lipides» (Pike, 2006). Cette notion a été énoncée par G. Van Meer et K. Simons (van Meer and Simons, 1988). Au cours de leurs travaux, ils ont démontré que des lipides s'agrégeaient en microdomaines pour former des vésicules participant à la polarité cellulaire dans des cellules épithéliales. Les microdomaines sont des structures très dynamiques qui se forment en fonction des besoins de la cellule. De ce fait, leur composition exacte est difficile à déterminer. L'une des caractéristiques principales des nano- et microdomaines lipidiques est leur enrichissement en cholestérol et en sphingolipides, au détriment des glycérophospholipides. Les phosphoinositides, et plus particulièrement le PI(4,5)P₂, ont également été décrits comme des constituants du feuillet interne de microdomaines lipidiques (Caroni, 2001 ; Parmryd et al., 2003 ; Gokhale et al., 2005) (**Figure 21**).

Du fait de leur composition, les micro-domaines lipidiques seraient moins fluides que la membrane environnante. De plus, 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). De par leurs propriétés physiques particulières, les rafts jouent un rôle important dans les événements faisant intervenir des courbures de la membrane. 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. La formation de ces microdomaines favoriserait encore cette diminution de la tension de ligne et rendrait la courbure et leur formation énergétiquement plus favorable (Garcia-Saez et al., 2007 ; Schuck and Simons, 2004).

Les microdomaines lipidiques sont impliqués dans le trafic membranaire, où ils formeraient des plateformes de tri sélectif pour l'adressage d'un compartiment cellulaire à l'autre. Les rafts sont impliqués dans les phénomènes d'endocytose. Il en est de même pour l'exocytose. Les protéines SNARES sont présentes dans ces microdomaines lipidiques (Chamberlain et al., 2001 ; Lang et al., 2001). Au laboratoire, les travaux de Sylvette Chasserot ont pu montrer l'implication de la protéine Annexine 2 au cours des étapes tardives d'arrimage et/ou dans l'amorçage des granules de sécrétion (Chasserot-Golaz et al., 2005). L'annexine A2 aurait pour rôle de promouvoir l'association de ces microdomaines lipidiques afin qu'ils puissent servir de point d'ancrage à la machinerie de l'exocytose. De plus les rafts

A



B

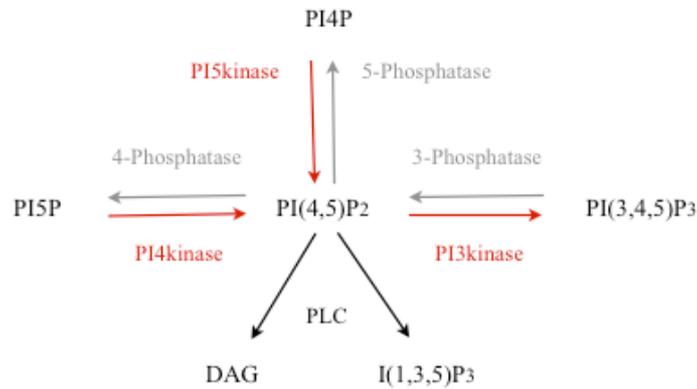


Figure 22: Synthèse et rôle du PI(4,5)P₂ dans les processus de trafic membranaire. A- Schéma représentant les mécanismes de trafic membranaire faisant intervenir le PI(4,5)P₂. B- Les voies de synthèse et de dégradation font intervenir des kinases (rouge) et des phosphatases (gris), ainsi que la phospholipase C. D'après Di Paolo 2006.

participeraient également au processus de bourgeonnement des granules de sécrétion (Kim et al., 2006).

B- Lipides impliqués dans les processus d'exo-endocytose

Il apparaît clairement aujourd'hui que les lipides jouent un rôle particulièrement important dans les mécanismes d'exocytose et d'endocytose. L'inventaire des rôles de chaque lipide dans ces processus serait trop long. Aussi, ai-je focalisé mon attention sur trois phospholipides qui nous intéressent particulièrement dans notre étude : le phosphatidylinositol (4-5)-bisphosphate (PI(4,5)P₂), l'acide phosphatidique (PA) et le phosphatidylsérine (PS).

1- Le phosphatidylinositol (4-5)-bisphosphate

Le phosphatidylinositol (4-5)-bisphosphate (PI(4,5)P₂) est un phosphatidylinositol inséré dans la couche interne de la membrane plasmique. Une grande variété de protéines sont capables de lier le PI(4,5)P₂ au niveau de sa tête polaire. A titre d'exemple, on peut noter une interaction avec la synaptotagmine, la PLCδ1, la dynamine, l'annexine 2 où les protéines kinases PI3-kinase de classe II. Le PI(4,5)P₂ a une position idéale pour interagir avec ses différents partenaires, ce qui lui permet de contrôler les événements à l'interface cytosol-membrane. Il facilite le recrutement de protéines mais il est également capable de réguler leur activité, gérer les interactions entre la membrane plasmique et le cytosquelette d'actine ou jouer un rôle dans les cascades de signaux extracellulaires. Aussi, ce phospholipide est impliqué dans différents processus du trafic membranaire (**Figure 22 A**) (Di Paolo and De Camilli, 2006).

Le niveau cellulaire de PI(4,5)P₂ est sous le contrôle d'un ensemble de phosphatidylinositol kinases (phosphorylant en position 3, 4 ou 5) et de phosphatidylinositol phosphatases (déphosphorylant en position 3, 4 ou 5) ainsi que de la phospholipase C (PLC) (**Figure 22 B**). Il existe différentes isoformes de ces enzymes avec des localisations variables.

a- PI(4,5)P₂ et exocytose

L'implication du PI(4,5)P₂ dans le processus d'exocytose est communément admise. En effet, l'inactivation génique par ARN interférents de la PI(4)P 5-kinase γ et de la PI(4)kinase β bloquent drastiquement la sécrétion dans les cellules neuroendocrines (Waselle et al., 2005). Le PI(4,5)P₂ pourrait agir au cours du processus d'arrimage des granules de sécrétion. En effet, des approches électrophysiologiques montrent qu'en absence de PI(4,5)P₂, la taille de la

population granulaire rapidement libérable (RRP) est diminuée (Milosevic et al., 2005). Une étude récente réalisée *in vitro* suggère que le PI(4,5)P₂ pourrait participer à la régulation des phénomènes de fusion par interaction avec la protéine SNARE syntaxine 1 (James et al., 2008).

La localisation du PI(4,5)P₂ est intéressante au niveau de l'exocytose. Des études réalisées sur des feuillettes de membrane produits par sonication suggèrent que le PI(4,5)P₂ semble enrichi au niveau de clusters, reflétant ainsi la possibilité d'une répartition particulière (Laux et al., 2000 ; Milosevic et al., 2005). De plus, une étude réalisée sur les cellules PC12 suggère que la formation de « micro-domaines » de PI(4,5)P₂ au cours de l'exocytose permettrait de séquestrer la protéine SNARE syntaxine (Aoyagi et al., 2005). Ceci a été confirmé par des travaux, utilisant une sonde liant le PI(4,5)P₂ qui ont permis de préciser que 6% de la quantité totale de PI(4,5)P₂ sur le feuillet cytoplasmique étaient localisés au niveau des sites d'arrimage des vésicules sous forme de microdomaines (James et al., 2008)

De plus, PI(4,5)P₂ interagît avec des protéines impliquées au cours de l'exocytose, c'est le cas notamment avec de l'annexine2 ou la synaptotagmine. L'annexine 2, protéine capable de lier le PI(4,5)P₂, est responsable de la formation de microdomaines au site de l'exocytose. Cette interaction pourrait participer à la formation de ces microdomaines (Chasserot-Golaz et al., 2005 ; Gokhale et al., 2005). La synaptotagmine se lie au PI(4,5)P₂ par sa partie polybasique du domaine C2B. La présence ou non de calcium induit une liaison différentielle du domaine C2B aboutissant à un changement de conformation de la protéine. (Bai and Chapman, 2004 ; Tucker et al., 2003). La synaptotagmine étant associée à la membrane vésiculaire et le PI(4,5)P₂ présent sur la membrane plasmique, cette interaction semble favoriser le rapprochement des membranes et pourrait également augmenter la vitesse d'insertion de la synaptotagmine à la membrane plasmique et par conséquent la vitesse de fusion en réponse à une stimulation (Bai and Chapman, 2004). Ces interactions pourraient expliquer à la fois un rôle dans l'arrimage du granule mais également dans les processus de fusion comme décrit précédemment.

Enfin, autre aspect intéressant, le PI(4,5)P₂ est capable de réguler le cytosquelette d'actine. Or, nous l'avons vu précédemment, l'actine est un élément majeur de la régulation de l'exocytose régulée. Le PI(4,5)P₂ inhibe l'activité des protéines de fragmentation comme la gelsoline, la cofiline ou encore la scindérine (Takenawa and Miki, 2001; Yin and Janmey, 2003). Un élément intéressant est que ces protéines, notamment la scindérine et la gelsoline, sont connues pour participer à la destructuration de la barrière d'actine lors de la stimulation

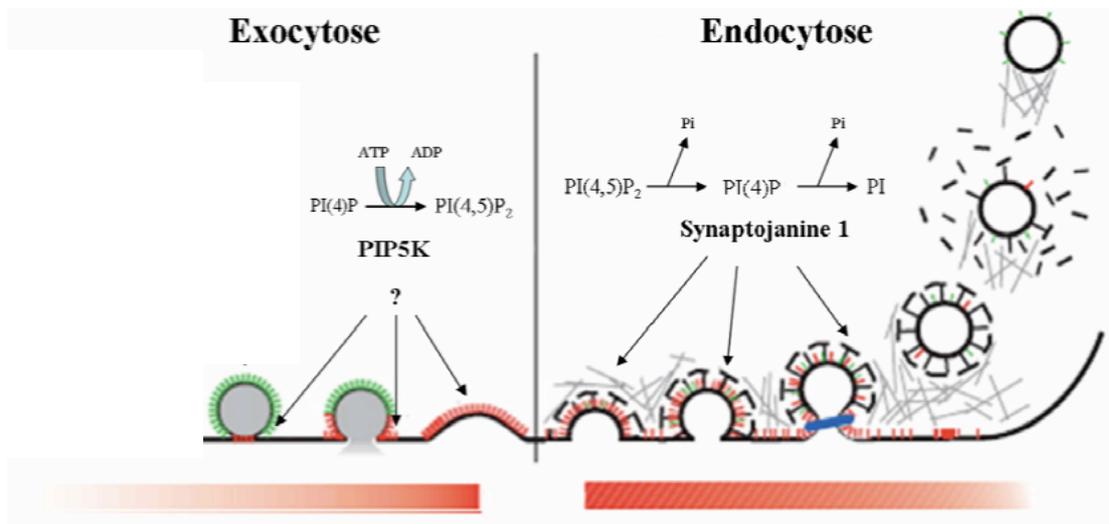


Figure 23: Rôles potentiels du PI(4,5)P₂ au cours du cycle d'exo-endocytose des vésicules synaptiques. D'après Di Paolo 2006

de l'exocytose (Bader et al., 1986 ; Vitale et al., 1991 ; Miyamoto et al., 1993). Le PI(4,5)P₂ pourrait intervenir à deux niveaux, dans le maintien de la barrière d'actine au repos ou dans les phases plus tardives de l'exocytose dans lesquelles l'actine est impliquée. Cependant, de tels rôles sont difficiles à concilier avec leur localisation à la membrane plasmique.

b- PI(4,5)P₂ et endocytose

Le PI(4,5)P₂ possède également un rôle important dans la régulation des processus d'endocytose. En effet, Le PI(4,5)P₂ peut se lier à des facteurs intervenant dans l'endocytose et notamment au complexe AP-180 ou AP-2 (Collins et al., 2002). L'association avec AP-2 semble indispensable au recrutement de la machinerie d'endocytose dépendante de la clathrine de récepteurs (Gaidarov and Keen, 1999). De la même façon, l'inhibition de formation de PI(4,5)P₂ induit une inhibition de l'endocytose du récepteur à la transferrine (Zoncu et al., 2007).

La synaptojanin est une phosphatase possédant un domaine inositol 5-phosphatase qui hydrolyse les phosphoinositides en position 5 (elle va dégrader le phosphatidylinositol (4-5)-bisphosphate (PI(4,5)P₂) en phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P)), un domaine PRD qui va permettre de lier des protéines à des domaines SH3 tels que l'endophyline ou l'amphiphysines et un domaine phosphatase Sac-1. Ce dernier est un domaine phosphatase des phosphoinositides avec peu de spécificités. Les études du groupe de P. De Camilli ont montré l'importance de cette protéine au cours de l'endocytose dépendante de la clathrine. En utilisant des souris synaptojanin 1^{-/-}, les auteurs observent une accumulation de puits recouverts de clathrine après stimulation de l'exocytose dans des neurones corticaux (Kim et al., 2002). Le domaine inositol 5-phosphatase pourraient travailler de concert avec le domaine Sac-1 pour déphosphoryler le PI(4,5)P₂ dans les phases tardives de l'endocytose. Le domaine PRD semble aussi être indispensable à l'endocytose (Mani et al., 2007). L'activité de la synaptojanin est dépendante du calcium (Wenk and De Camilli, 2004). Une hypothèse avancée est que la déphosphorylation du PI(4,5)P₂ permettrait de séparer des vésicules des protéines nécessaire aux premières étapes de l'endocytose (**Figure 23**).

2- L'acide phosphatidique

L'acide phosphatidique est un phospholipide important en terme d'exo-endocytose à double titre. De par sa structure, il favorise les courbures de membranes et de par ses charges négatives, il permet l'interaction avec les résidus basiques des protéines.

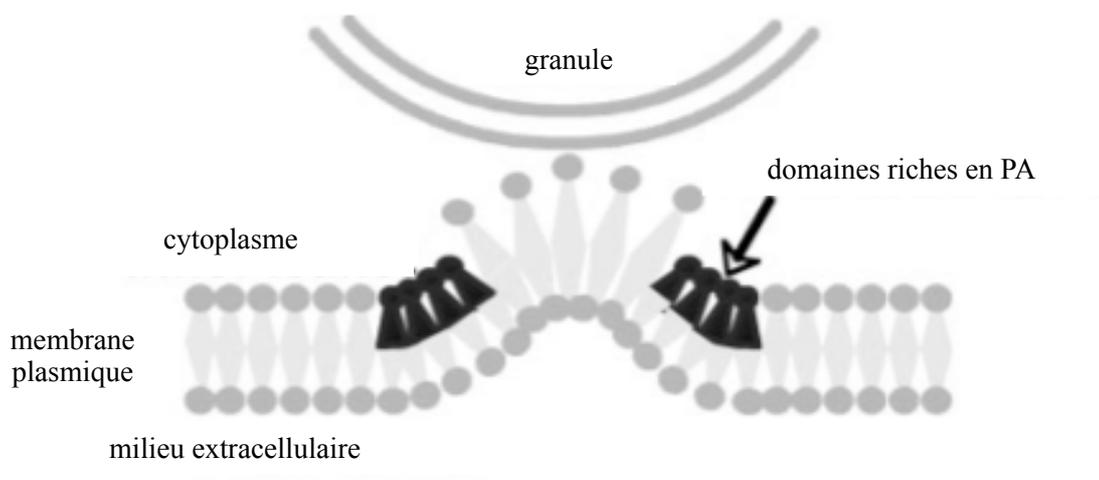


Figure 24 : Rôle du PA au cours de l'exocytose régulée des cellules chromaffines. Les domaines riches en PA participent à la formation de courbures de membranes facilitant la fusion entre la membrane du granule et la membrane plasmique D'après Zeniou-Meyer, Zabari et al. 2007.

a- Rôle dans les courbures membranaires

Le PA possède une petite tête polaire et se présente sous forme de cône inversé. Sa tête polaire hautement chargée est cloisonnée au niveau de son squelette de glycérol et tend à s'agréger (Boggs, 1987). Des expériences *in vitro* suggéraient une capacité du PA à induire des courbures de membrane (Verkleij et al., 1982). Ceci a été confirmé et le PA semble relativement instable au sein d'une membrane plane et devient plus stable dans des membranes présentant une courbure négative (Darios et al., 2007). Une étude réalisée au sein de notre laboratoire par l'équipe de Nicolas Vitale a pu mettre en évidence pour la première fois que la formation de PA au cours de l'exocytose des cellules chromaffines aboutissait à la formation de membranes nécessaires à la fusion entre la membrane du granule et la membrane plasmique. En effet, les analyses morphométriques en microscopie électronique utilisées lors de cette étude ont permis de constater une forte accumulation de PA au niveau de granules arrimés à la membrane plasmique. En absence de formation de PA, l'exocytose est inhibée. L'addition dans le milieu extracellulaire de lysophosphatidylcholine (PC), un lipide à cône inversé, restaure l'activité sécrétrice des cellules. Ainsi, le PA possède un rôle fusiogénique au cours de l'exocytose (**Figure 24**) (Zeniou-Meyer et al., 2007).

b- Activation de partenaires

Le PA est un lipide bioactif qui peut activer des enzymes, recruter des protéines ou servir de substrat dans la formation d'autres lipides (Jenkins and Frohman, 2005 ; Stace and Ktistakis, 2006).

Dans un contexte d'exocytose, une étude réalisée par le groupe d'E. Stuenkel a récemment permis de mettre en évidence un domaine basique qui lie le PA et le PI(4,5)P₂ à proximité du domaine SNARE de la syntaxine 1A (Lam et al., 2008). Cette interaction est importante pour la fonction de la syntaxine car sa neutralisation par mutagenèse dirigée semble affecter la cinétique des étapes tardives de l'exocytose. En effet, des analyses par ampérométrie ont révélé une altération de la dynamique du pore de fusion dans des cellules dont l'expression de la syntaxine endogène était inhibée par ARN interférent ou dans des cellules exprimant un mutant de la syntaxine pour ce domaine basique. Il est intéressant de constater que la surexpression de PLD1 permet de restaurer l'activité sécrétrice de cellules exprimant ce mutant de la syntaxine (Lam, Tryoen-Toth et al. 2008). Ces résultats suggèrent que la syntaxine permettrait de séquestrer le PA au niveau des sites d'exocytose pour lui permettre de jouer son rôle dans les phases ultimes de l'exocytose.

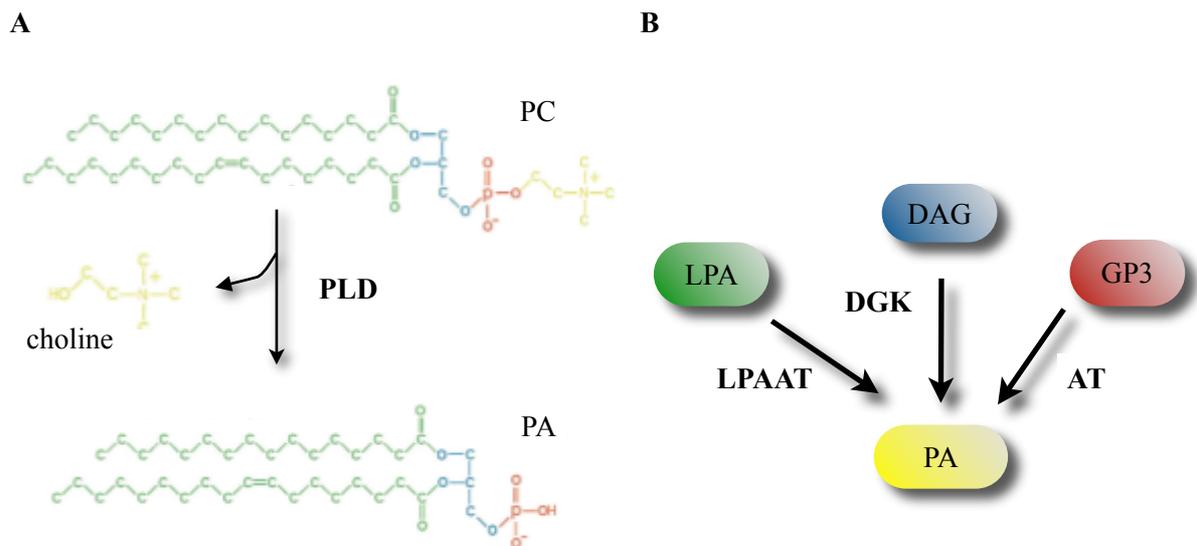


Figure 25: Les différentes voies de synthèse du PA. A- La PLD permet la formation de PA à partir de phosphatidylcholine. B- Les autres voies de synthèse possibles. LPA : acide lysophosphatidique. LPAAT : LPA acétyltransférase. PLA : phospholipase A. PAP : Phosphatidic Acid Phosphatase. DGK : Diacylglycerol Kinase. G3P : Glycérol 3 phosphate. AT : Acyltransferase.

Le PA interagit avec la PI5K *in vitro* (Moritz et al., 1992 ; Jenkins, Fiset et al. 1994). Ces expériences ont été complétées par une étude *in vivo* qui a permis de montrer une activation de la PIP5K par le PA provenant soit de l'activité de la PLD soit de l'activité de la diacylglycérol kinase (DGK) (Jones et al., 2000). De plus il semble que la liaison entre le PA et la PI5K favorise l'activité enzymatique de cette dernière (Stace et al., 2008).

c- La régulation de la formation de PA par la Phospholipase D

L'Acide phosphatidique est synthétisée à partir de différents lipides : la phosphatidylcholine, le Glycérol 3 phosphate, le diacylglycérol, ou acide lysophosphatidique (**Figure 25**). La voie de synthèse du PA par l'enzyme PLD à partir de la phosphatidylcholine nous intéresse particulièrement. Elle est beaucoup plus rapide et régulée que les autres voies ce qui laisse à penser que c'est la source de production de PA nécessaire à des phénomènes dynamiques tels que le trafic intracellulaire ou l'exocytose. Découverte à la fin des années 1940 dans des extraits de carotte, l'activité PLD est retrouvée dans différentes espèces dans lesquelles les principaux domaines protéiques de cette enzyme sont très conservés (pour revue (McDermott et al., 2004).

(i) Les isoformes de la PLD

Chez les mammifères, la PLD possède deux isoformes : la PLD1 et la PLD2. Les deux protéines possèdent entre 50 à et 53 % d'identité de séquence. Elles diffèrent essentiellement au niveau de leur régions C et N terminal (Colley et al., 1997) ce qui leur confère des interactions avec des protéines différentes. Au point de vue enzymatique, la PLD2 possède une activité de base beaucoup plus importante que la PLD1.

(ii) La structure et la régulation de la PLD1

La PLD possède quatre régions (nommées I à IV) possédant deux motifs HKD importants pour l'activité catalytique. La région N-terminale contient un domaine PH capable de lier les phosphoinositides tels que le PI(4,5)P₂ ainsi qu'un domaine PX liant lui aussi des phosphoinositides. Ces deux domaines participent à une localisation de la PLD au niveau des membranes (Exton, 1999). L'activité enzymatique de la PLD est régulée par différents partenaires dont la protéine kinase C, le PI(4,5)P₂, ainsi que, et nous le verrons au cours du chapitre 2, par les GTPases de la famille des Rho et de ARF (**Figure 26**).

(iii) PLD, exocytose et endocytose

Des travaux réalisés au laboratoire montrent l'importance de la PLD1 dans les processus d'exocytose. En effet, l'utilisation d'ARN interférents dirigés contre les deux

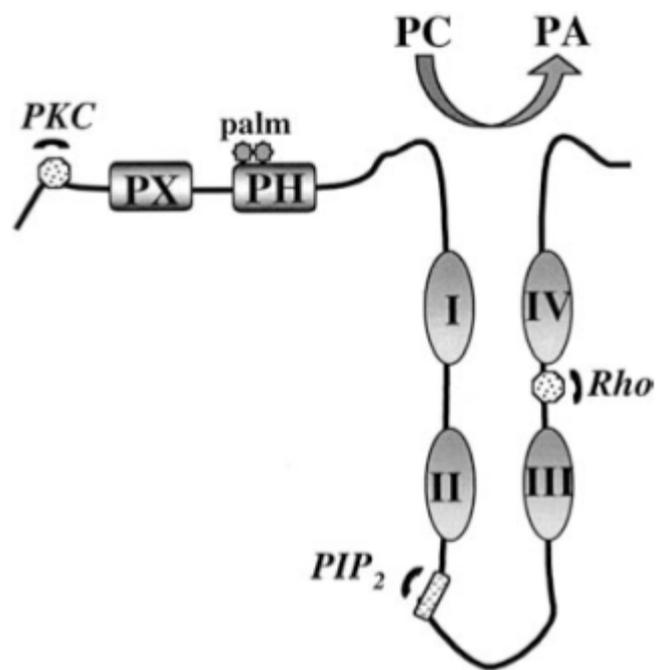


Figure 26: Représentation de la structure de la PLD. D'après Ktitakis 2003.

isoformes montrent que seule la PLD1 régule ce processus dans les cellules PC12 (Zeniou-Meyer et al., 2007). De façon intéressante, il semble que la liaison de la PLD1 avec le PI(4,5)P₂ soit nécessaire à l'exocytose dans les cellules PC12 (Du et al., 2003).

La PLD a également été impliquée dans des mécanismes d'endocytose de récepteurs à la transferrine et à l'EGFR pour revue (Roth, 2008). Le domaine PX de la PLD est capable de réguler l'activité GTPasique de la dynamine. De plus, lorsque les cellules n'expriment plus la PLD, il se produit une diminution de l'internalisation du récepteur à l'EGF. Cette inhibition est restaurée lorsque la PLD1 sauvage est surexprimée, ce qui n'est pas le cas lorsque lors de la surexpression de la PLD mutée ne possédant plus le domaine PH (Lee et al., 2006).

3- Le Phosphatidylsérine

Le PS représente entre 2 et 10 % des lipides composant les membranes cellulaires (Haucke and Di Paolo, 2007 ; Zachowski et al., 1989). Selon l'organisation asymétrique de la membrane, il est préférentiellement présent sur la face cytosolique. Il participe avec le PA, le PI(4,5)P₂ et le PIP₃ à la génération de domaines chargés négativement au niveau du cytoplasme. Cet environnement permet le recruter de nombreux acteurs protéiques (McLaughlin and Murray, 2005). A l'heure actuelle, il a été mis en évidence une interaction du PS avec 28 protéines différentes. Cependant, contrairement aux autres phospholipides, le rôle du PS dans des processus biologiques est moins étudié.

On peut recenser un rôle important dans le recrutement de protéines à la membrane plasmiques telles que C-Raf1, la pompe ATPase Na⁺/K⁺ ou encore la protéine chaperonne « Heat shock protein » 70 (Hsp 70), pour revue (Vance and Steenbergen, 2005).

Le PS est capable de lier des protéines impliquées au cours de l'exocytse comme la PKC, l'annexine 2 ou la synaptotagmine (Stace and Ktistakis, 2006). Cependant, une relation avec le processus d'exocytose n'a pas été établie qu'avec la liaison avec la synaptotagmine. En effet, une étude *in vitro* a montré que la synaptotagmine 1 pouvait accélérer la fusion de liposome présentant des protéines SNARE en présence de PS et de calcium. En absence de PS, l'effet de la synaptotagmine 1 est considérablement inhibé (Bhalla et al., 2005).

Une translocation de PS intervient dans différents processus biologiques tels que la coagulation sanguine, la maturation des spermatozoïdes ou l'apoptose (Vance and Steenbergen, 2005). Une translocation du PS est observée après stimulation de l'exocytose

dans différents modèles cellulaires. Cette translocation a fait l'objet de notre seconde étude et je développerai ce point au cours du chapitre 3.

Régulation de la production d'acide phosphatidique au cours de l'exocytose : rôle de Rac1

I- Introduction sur les GTPases monomériques

A- La superfamille des Ras

Les GTPases de la superfamille Ras sont de petites protéines G dont le poids moléculaire varie entre 20 et 30 kDa. Relativement bien conservées entre les espèces, les membres de cette superfamille se divisent en 5 sous familles : les GTPases Ran, Ras, Rab, Arf, et Rho. L'ensemble des petites protéines G possède un mode de fonctionnement commun et une base structurale similaire mais présentent des différences au niveau de leurs modifications post-traductionnelles, de leurs localisations, de leurs régulateurs et de leurs effecteurs. De par ces divergences, cette superfamille de GTPases a des rôles cellulaires très variés:

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

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

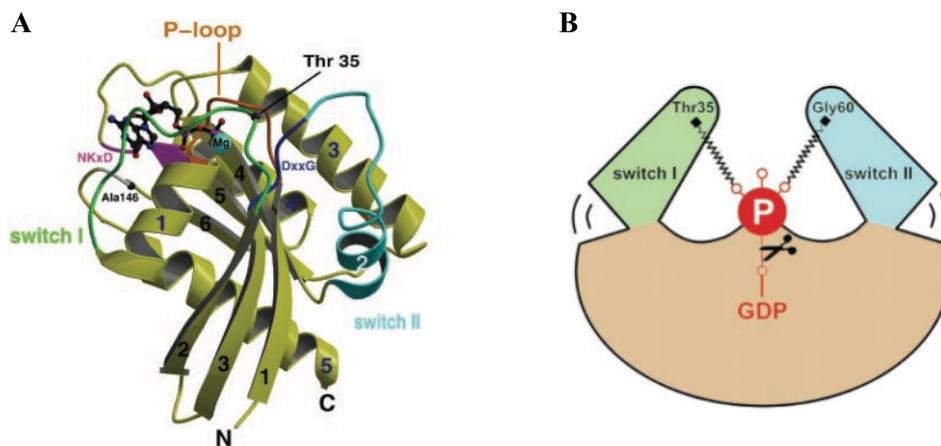


Figure 27: Structure 3D du domaine G des GTPases et effet de la liaison au GTP sur la conformation de la GTPase. A- Le domaine G est constitué de six feuillets β bordés par cinq hélices α . Le domaine P loop (en orange) permet la liaison au nucléotide et au Mg^{2+} . B- Le phosphate γ du GTP va lier les résidus thréonine et glycine des régions switch 1 et 2 et leur conférer une conformation particulière permettant à la GTPase de lier ses effecteurs. D'après Vetter and Wittinghofer 2001.

B- Mode de fonctionnement

Les GTPases sont des interrupteurs moléculaires capables d'activer ou d'inhiber des voies de signalisation en fonction de leur état d'activation. En effet, lorsqu'elles sont liées au GDP (Guanosine Di-Phosphate), elles sont inactives. Le remplacement du GDP par du GTP (Guanosine Tri-Phosphate) active la GTPase qui peut alors lier ses effecteurs. Le retour à l'état inactif se fait par hydrolyse du GTP en GDP, réaction qui libère un phosphate inorganique (Pi). Le domaine supportant la liaison et l'hydrolyse du GTP est appelé domaine G. Il est constitué de six feuillets β bordés de cinq hélices α (**Figure 27 A**). L'interaction du nucléotide se fait par le domaine conservé « P loop » (phosphate-binding loop). La présence d'un ion Mg^{2+} est indispensable à la stabilisation du nucléotide mais également à l'activité GTPasique. La différence de liaison du GDP et du GTP réside dans le phosphate γ du GTP. Dans la forme GTP, deux ponts hydrogènes vont se créer entre ce phosphate et deux résidus thréonine et glycine des régions switch 1 et 2 respectivement. Cette liaison va aboutir à un changement de conformation des régions switches qui va permettre l'interaction avec des effecteurs (**Figure 27 B**). Une fois le GTP hydrolysé, les régions switches se "relâchent" et adoptent la conformation spécifique de la forme liée au GDP. Les GTPases possèdent des activités GTPasiques intrinsèques relativement lentes. La régulation du cycle d'activation/inactivation fait intervenir des facteurs d'échanges et des protéines stimulant l'activité GTPasique (Takai et al., 2001). Les régulateurs des GTPases sont traités en détails page 48.

C- Les GTPases de la famille Rho

1- Généralités

Chez les mammifères, les GTPases Rho (Ras-homologous) sont constituées d'une vingtaine de membres (**Figure 28**) (Heasman and Ridley, 2008). RhoA fut la première protéine de cette famille à être découverte. Ce sont Madaule et collaborateurs qui la clonèrent en 1985 à partir d'ADN complémentaire d'aplysie (*Aplysia californica*), puis qui identifièrent les homologues humains RhoA, RhoB et RhoC (Madaule and Axel, 1985). Rac1, Rac2 et Cdc42 furent les suivants à être clonés puis étudiés. A l'heure actuelle, les sous familles Rho, Rac et Cdc42 restent les plus étudiées. Au début des années 90, les travaux du groupe d'Allan Hall mettent en évidence le rôle primordial de ces GTPases sur la régulation du cytosquelette d'actine (Ridley and Hall, 1992 ; Nobes and Hall, 1995). Depuis, diverses autres fonctions,

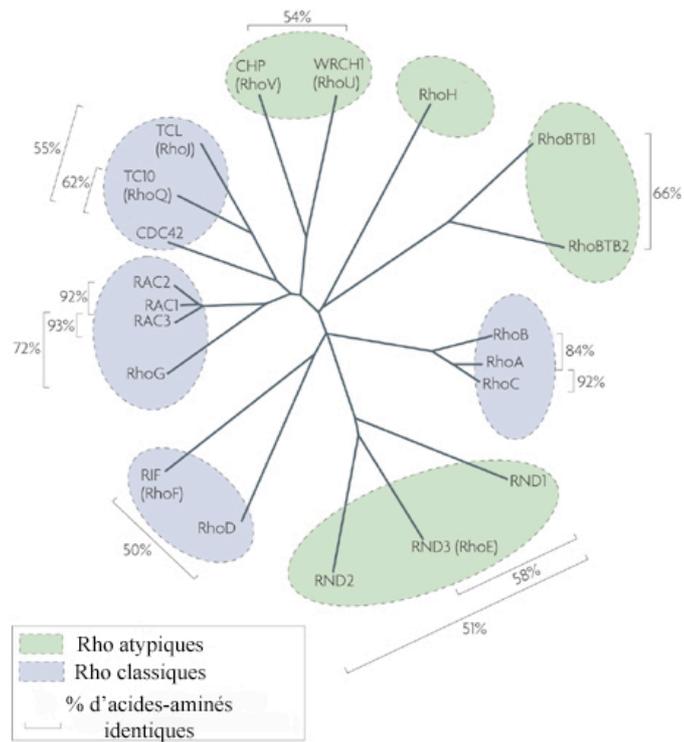


Figure 28: La famille des GTPases Rho. Adapté de Heasman et Ridley, 2008

indépendantes du cytosquelette, leur ont été attribuées. Leur localisation subcellulaire est principalement membranaire. On les retrouve à la membrane plasmique, mais également sur d'autres compartiments tels que l'appareil de Golgi, les mitochondries, ou encore les endosomes (Ridley, 2006). Cette localisation membranaire est essentiellement due à leurs modifications post-traductionnelles. En effet, les GTPases Rho possèdent une séquence particulière dans la région C-terminal (C-A-A-X) à laquelle peuvent être ajoutés des groupements lipidiques de type farnésyl, géranylgeranyl, palmitoyl ou encore des groupements méthyles.

2- Outils permettant d'étudier les GTPases Rho

En dehors des ARN interférents, deux types d'outils sont généralement utilisés pour mettre en évidence l'implication et les fonctions des GTPases Rho au sein de la cellule : les mutants d'activité et les toxines bactériennes.

Des mutants dominants négatifs existent pour les GTPases de la famille des Rho. La mutation, en position 17 pour Rac, remplace une Thréonine par une Asparagine. Cette mutation permet la liaison son facteur d'échange (ou GEF, cf. page 51) mais empêche la fixation du GTP. Une fois liée, le facteur d'échange est séquestré par le mutant et tous deux forment un complexe stable sans nucléotide. L'inconvénient majeur de ces mutants est qu'ils titrent les GEF, et comme les GTPases Rho ont des GEF communs, un mutant de Rac dominant négatif peut potentiellement agir sur les voies des autres GTPases (Feig, 1999). Les mutants « constitutivement actifs » sont des substitutions des acides aminés Valine et Leucine en Glutamine et Glycine respectivement (en position 12 et 61 pour Rac), qui empêchent l'hydrolyse du GTP en GDP. Les Mutants peuvent en permanence activer leur effecteurs (Bishop and Hall, 2000). La surexpression de protéines peut induire une dérégulation spatiotemporelle et activer des effecteurs de façon aspécifique (Wang and Zheng, 2007). De plus, il existe des interconnexions entre les GTPases et la modification de l'activité de l'une pourrait agir sur la voie en aval de l'autre (Burridge and Wennerberg, 2004)

Les GTPases Rho sont la cible de nombreuses toxines bactériennes (toxines clostridiales ou exoenzymes de type C3). Elles peuvent être spécifiques à certaines GTPases ou toucher toutes les GTPases. De ce fait, ces toxines sont largement utilisées comme outils pour étudier l'implication des GTPases, notamment en neurotransmission où les préparations de neurones et de tranches de cerveau sont très difficiles à transfecter. Ces toxines vont affecter l'activité des GTPases par des modification covalentes ou non covalentes (glucosylation, ADP-

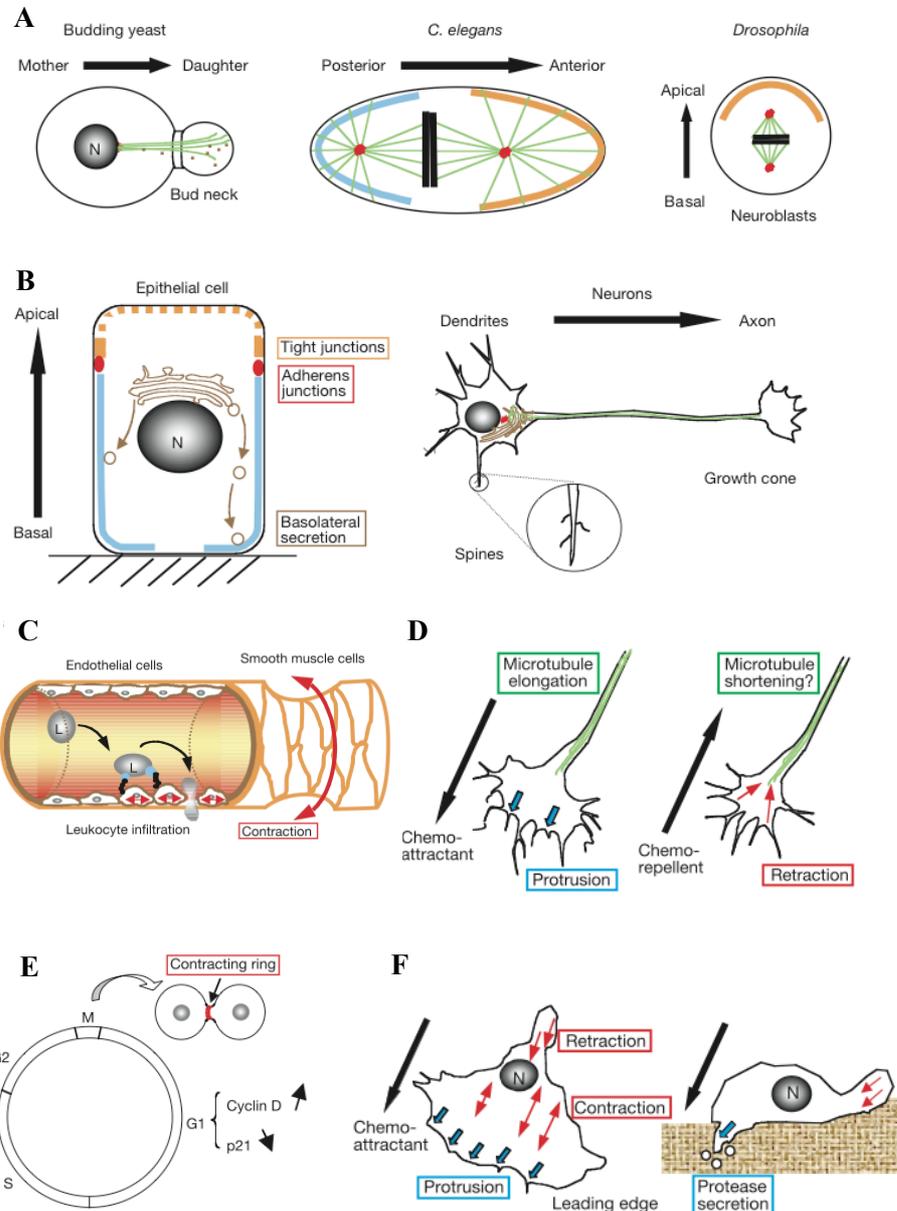


Figure 29: Illustration résumant les fonctions cellulaires au cours desquelles les GTPases Rho ont été mis en évidence. Les GTPases Rho sont impliquées au cours de la polarité cellulaire (A), la morphogénèse (B), la contraction (C), la croissance et la guidance axonale (D), la cytokinèse (E) le chimiotactisme et l'invasion cellulaire (F). D'après Etienne-Manneville and Hall 2002.

ribosylation, transglutamination et déamidation) (Gasman et al., 1999b ; Boquet, 2000). Cependant, elles ne peuvent pas discriminer les différentes isoformes des GTPases.

3- Voies effectrices majeures

Les GTPases de la famille Rho sont impliquées dans de nombreuses fonctions vitales aussi variées que la morphogenèse, la croissance axonale et dendritique, le trafic membranaire, la polarité et la différenciation cellulaire, l'adhésion ou encore le cycle cellulaire (**Figure 29**) (pour revue (Heasman and Ridley, 2008 ; Burridge and Wennerberg, 2004 ; Etienne-Manneville and Hall, 2002)). Dans la plupart des cas, les protéines Rho sont impliquées dans des fonctions cellulaires en régulant l'organisation du cytosquelette d'actine et/ou en contrôlant le métabolisme des lipides. Je vais décrire ici ces deux principales voies effectrices. Etant donné le contexte de notre étude, je traiterai ensuite plus en détail le rôle des GTPases Rho dans les phénomènes de trafic membranaire.

a- Rho et régulation du cytosquelette d'actine

Avec les microtubules et les filaments intermédiaires, l'actine est un des éléments composant le cytosquelette. Dans les cellules eucaryotes, elle est présente sous deux formes: l'actine globulaire (actine G) qui peut polymériser pour former des filaments (actine F). La polymérisation de l'actine se déroule en plusieurs étapes et nécessite l'intervention d'ATP et d'ions divalents (pour plus de détails, voir la **figure 30**). Dans la cellule, l'actine F se présente sous forme de filaments courts, de faisceaux de filaments parallèles ou de réseau dense de filaments interconnectés.

En utilisant des mutants dont l'activité GTPase est déficiente, l'équipe d'Alan Hall montra que l'activation de RhoA dans les fibroblastes entraînait la formation de câble d'actine (Stress fibers), tandis que l'activation de Cdc42 et de Rac provoquait respectivement l'apparition de filopodes et de lamellipodes (Ridley and Hall, 1992 ; Ridley and Hall, 1992 ; Nobes and Hall, 1995). Le contrôle de la dynamique de l'actine par les protéines Rho peut passer par l'activité coordonnée de différents types d'effecteurs. Les deux principaux sont Arp2/3 et les formines (**Figure 31**). En effet, Cdc42 peut activer la polymérisation d'actine *via* Arp2/3 en passant par une cascade impliquant N-WASP alors que Rac passera plutôt par WAVE ou SCAR. Les formines représentent aussi un mécanisme important d'induction de la polymérisation d'actine chez les eucaryotes. Dans ce cas particulier, le mode de nucléation de l'actine reste toutefois encore mystérieux du fait du manque de protéines connues associées à l'actine au sein du complexe de nucléation. Rho stimule ce processus *via* mDia1, une formine

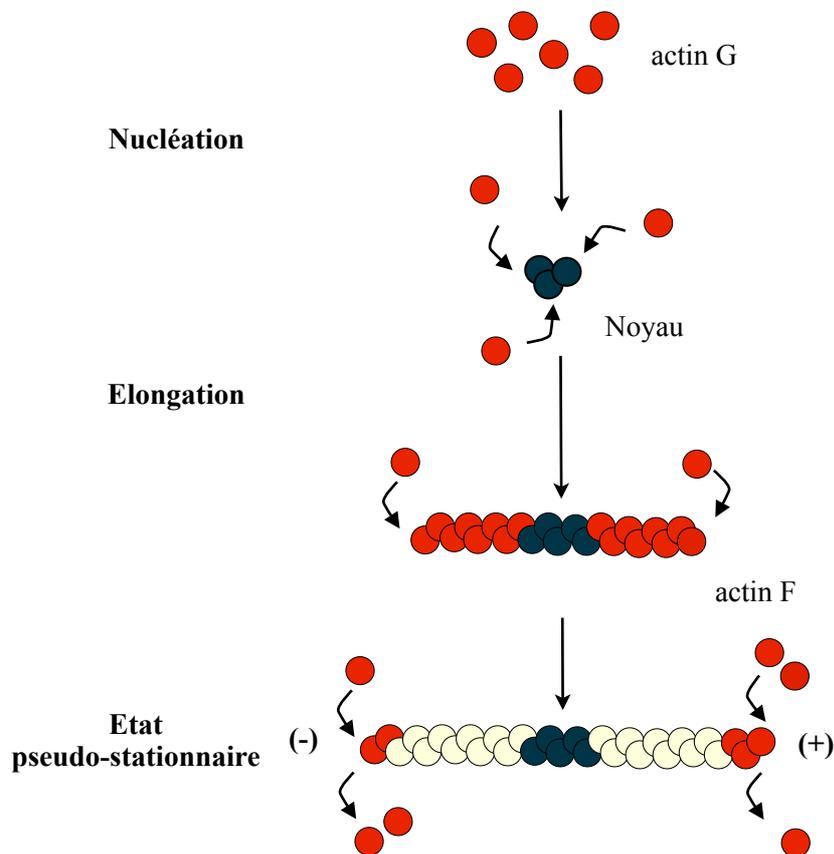


Figure 30 : Processus de polymérisation de l'actine. Au cours de la nucléation, trois monomères d'actine vont former la structure de départ nécessaire à l'élongation du nouveau filament. Le filament d'actine obtenu possède une extrémité B (pour « barbed end ») ou extrémité (+) qui favorisera l'assemblage des monomères et une extrémités P (pour « pointed end ») ou extrémité (-) qui favorisera plutôt leur dissociation. A l'équilibre (état pseudo-stationnaire), la dissociation à l'extrémité P est compensée par l'addition de monomères à l'extrémité B. La longueur du filament ne varie alors plus mais il n'est pas figé pour autant puisqu'il se déplace d'une extrémité à l'autre. On parle alors de processus de « tapis roulant ». Des protéines vont réguler l'assemblage et le désassemblage des filaments d'actines (CapZ, Cofilin, Gelsolin, Formine, Arp2/3, mDia, scindérine...), la stabilisation des filaments (tymosin beta4, Dnase 1, tropomyosine...), la réticulation des filaments (Arp2/3, WASP, WAVE...) ou encore la liaison des filaments aux membranes (spectrine...).

apparentée à diaphanous (Diaphanous Related Formin), qui est une cible directe de Rho. La GTPase activée se lie à la formine, lève l'auto-inhibition constitutive de la protéine et expose ainsi le domaine FH2 (Formin Homology). C'est au niveau de ce domaine caractéristique des formines que peut se lier l'extrémité B du filament d'actine (Zigmond, 2004). mDia1 contient aussi un domaine FH1 essentiel qui interagit avec un dimère cofiline/actine qu'il "amène" à l'extrémité du filament d'actine. Une fois que mDia1 a ajouté sa pierre à l'édifice, il reste toujours lié au filament d'actine, prêt à ajouter de nouveaux monomères.

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

b- Rho et dynamique des lipides

Bien que les GTPases Rho restent incontestablement des régulateurs clés du cytosquelette d'actine, elles possèdent aujourd'hui un champ d'action plus large. De façon intéressante, elles interviennent également dans la régulation du métabolisme des lipides. En effet, plusieurs études montrent que RhoA, Cdc42 ou Rac1 peuvent contrôler l'activité de certaines phospholipases ou phosphatidylinositol-kinases. Par exemple, Rac1 RhoA et Cdc42 stimulent la synthèse de PI(4,5)P₂ en activant la phosphatidylinositol-5 kinase (Tolias et al., 2000 ; Oude Weernink et al., 2000). Notons que seuls Rac1 et RhoA semblent agir directement sur cette kinase (Ren et al., 1996) A l'inverse, il a été montré que ces GTPases peuvent participer également à la dégradation du PI(4,5)P₂. C'est le cas de Rac et de RhoA qui stimulent respectivement la phospholipase C γ et la phospholipase C ϵ , deux enzymes qui catalysent la transformation du PI(4,5)P₂ en Inositol tri-phosphate (IP3) et en diacylglycérol (Bunney and Katan, 2006; Walliser et al., 2008). Enfin, la GTPase Rac1 peut également favoriser la conversion du PI(4,5)P₂ en PI(4)P en stimulant l'activité de la synaptojanine, une 5-phosphatase spécifique du PI(4,5)P₂ (Malecz et al., 2000).

RhoA, Cdc42 et Rac1 son également capables d'interagir avec la phospholipase D1 *in vitro* et peuvent participer directement à son activation (Hammond et al., 1997 ; Hodgkin et al., 1999). De plus, il a été montré que le traitement de fibroblastes par différentes toxines bactériennes inhibant les GTPases Rho (cf page 43), entraîne une inhibition de l'activation de

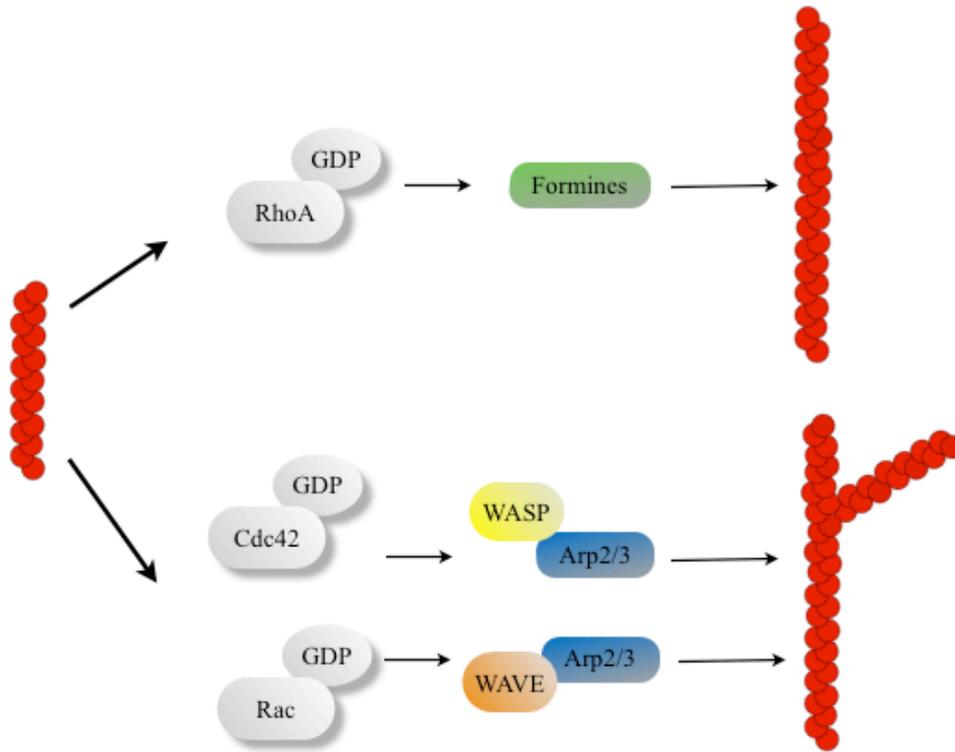


Figure 31: Effet de l'activation de RhoA, Cdc42 ou Rac sur la polymérisation des filaments d'actine. La GTPase RhoA active des formines qui vont permettre l'élongation des filaments d'actine. Cdc42 et Rac activent les effecteurs respectifs, WASP et WAVE. Ces derniers vont s'associer au complexe Arp2/3 afin d'initier des branchements au niveau des filaments d'actine.

la PLD (Malcolm et al., 1996). Ces résultats suggèrent que les GTPases Rho ont la capacité d'influencer le niveau cellulaire d'acide phosphatidique.

4- Rho et trafic membranaire

a- Dynamique de la membrane plasmique

En influençant la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine et le métabolisme des phospholipides, les GTPases Rho apparaissent comme des acteurs essentiels dans les phénomènes de dynamique de membranes (Ridley, 2006). La dynamique de la membrane plasmique peut prendre plusieurs aspects, comme les pseudopodes, les lamellipodes ou encore les filopodes. Ainsi au cours de la phagocytose induite par l'activation du récepteur FcR, la réorganisation du cytosquelette d'actine est dépendante des GTPases Cdc42 et Rac1 et permet l'initiation et l'extension de pseudopodes membranaires autour de la particule phagocytée, aboutissant alors à la formation du phagosome (Hall et al., 2006). Les GTPases Rac1 et Cdc42 agissent dans la migration cellulaire en formant des lamellipodes. Ces larges expansions de membrane plasmique sont retrouvées à l'avant des cellules en cours de migration et contiennent un important réseau de filaments d'actine régulés par les GTPases Rac1 et Cdc42. Enfin, les filopodes sont des expansions de membrane plasmique qui contiennent des filaments d'actine organisés en faisceaux parallèles. Ils sont importants dans tous les processus de perception de l'environnement par la cellule ; là aussi les GTPases de la famille Rho sont impliquées : Rac1 et Rac2, Cdc42 mais aussi Wrch1, RhoD et Rif (Aspenstrom et al., 2004).

b- Trafic vésiculaire

Plusieurs GTPases de la famille Rho se trouvent localisées sur des membranes de compartiments intracellulaires autres que la membrane plasmique et peuvent ainsi agir sur le trafic vésiculaire à plusieurs niveaux (**Figure 32**). C'est le cas de Cdc42, qui est retrouvée au niveau de l'appareil de Golgi. Elle y active N-WASP et permet ainsi de réguler le transport du compartiment golgien vers le réticulum endoplasmique (Luna et al., 2002). Cdc42 peut aussi se lier au coatomer recouvrant les vésicules golgiennes, inhibant ainsi son interaction avec la dynéine et par conséquent le transport permis par ce moteur moléculaire des microtubules (Chen et al., 2005). Les protéines TCL et TC10, dont la séquence est apparentée à celle de Cdc42, ont aussi un rôle dans les processus de trafic vésiculaire. En effet, TC10 régule la translocation du transporteur du glucose GLUT4 induit par l'insuline (Jiang et al., 2002) alors que TCL est impliquée dans le mouvement des endosomes contenant les récepteurs à la

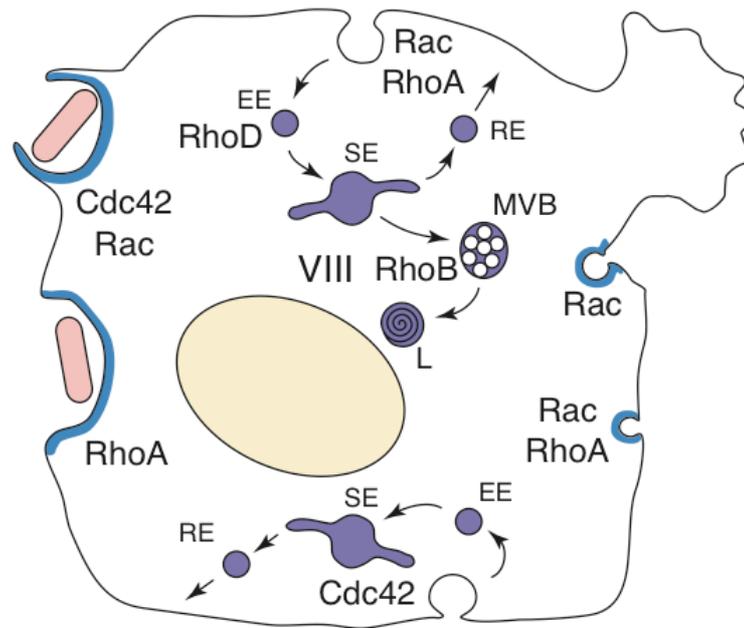


Figure 32: Implication des GTPases de la famille Rho dans le trafic vésiculaire. EE: endosomes précoces, MVB: corps multivésiculaires, L: lysosomes, SE: endosomes de tri, RE: endosomes recyclés. D'après Ellis et Mellor, 2000.

transferrine (de Toledo et al., 2003). Concernant les endosomes, RhoB a été identifiée sur ces organelles et son rôle serait de ralentir le trafic des récepteurs membranaires tels que le récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor) vers les endosomes tardifs (Gampel et al., 1999). Une autre GTPase, RhoD, régule la motilité des endosomes précoces en activant séquentiellement hDia2C et la kinase c-Src (Gasman et al., 2003).

Les Rho interviennent également au cours des mécanismes d'endocytose. La surexpression de mutants constitutivement actifs de RhoA ou Rac aboutit à une inhibition de l'endocytose de récepteurs dépendante de la clathrine (Lamaze et al., 1996). Le rôle de Rac pourrait passer par la synaptojanine2, qui est une phosphatase induisant la perte de la clathrine sur les vésicules qui en sont recouvertes (Marqueze et al., 2000). RhoA régulerait l'endocytose du récepteur par une voie impliquant ROCK et l'endophiline (Kaneko et al., 2005). De plus, Rac intervient notamment dans la macropinocytose et agit sur des effecteurs comme Arp2/3, WAVE (Qualmann and Mellor, 2003). La fonction de la GTPase RhoA a été mise en évidence au cours de l'internalisation du récepteur à l'interleukine. Elle est associée à des microdomaines lipidiques (Lamaze et al., 2001). Cdc42 pourrait jouer un rôle dans l'endocytose d'ancre glycosylphosphatidylinositol ou endocytose de phase fluide, de plus petite taille que la macropinocytose (Sabharanjak et al., 2002).

Qu'en est-il des phénomènes d'exocytose régulée qui nous intéressent plus particulièrement ici ?

L'expression de mutants constitutivement actifs Rac^{V12} et Cdc42^{V12} stimule la dégranulation dans la lignée de mastocytes RBL-2H3 (Hong-Geller and Cerione, 2000). Les auteurs proposent une voie d'activation régulant le cytosquelette d'actine et la formation de PI(4,5)P₂ par la PLC. Le PIP dégradé formerait du DAG, produit activant la PKC. Dans des « souris KO » n'exprimant plus Rac2, l'isoforme présent dans les cellules hématopoïétiques, les auteurs observent une inhibition de l'exocytose des granules primaires (Abdel-Latif et al., 2004). De plus, l'importance de Rac et Cdc42 au cours de l'exocytose dans les cellules β pancréatiques a été démontrée en 1997 grâce à l'utilisation de toxines inhibant spécifiquement différentes protéines Rho (Kowluru et al., 1997). Cependant, les effecteurs n'ont pas été identifiés dans ce modèle.

Au laboratoire, des travaux de l'équipe de Bernard Poulain ont montré l'implication de Rac dans l'exocytose régulée dans la synapse du ganglion buccal d'aplysie. L'utilisation différentielle de toxines bactériennes a pu mettre en évidence une inhibition dans les étapes ultimes de la sécrétion d'acétylcholine au niveau de ces synapses (Doussau et al., 2000). Ces

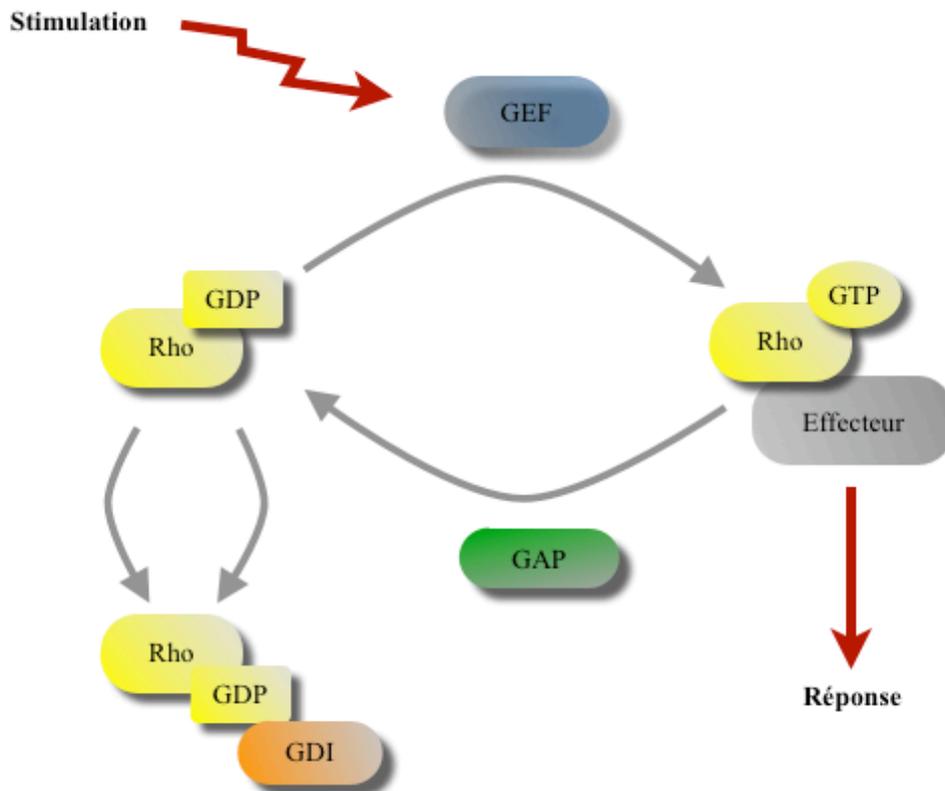


Figure 33 : Cycle d'activation/inactivation des protéines Rho. Liées au GDP, les protéines Rho sont incapables d'interagir avec leurs effecteurs. Elles peuvent être séquestrées par un GDI (guanine-nucleotide dissociation inhibitor), ou alors interagir avec un facteur d'échange (GEF) qui leur permettra d'accélérer l'échange GDP/GTP. Une fois liée au GTP, la protéine Rho peut lier ses effecteurs et activer une cascade moléculaire. Pour terminer le cycle, une protéine GAP (GTPase activating Protein) intervient afin d'augmenter la vitesse d'hydrolyse du GTP. La protéine retourne alors à l'état inactif. Adapté de Jaffe and Hall 2005.

résultats ont été confirmés par Yann Humeau trois ans plus tard ou il précisait l'implication de Rac comme acteur nécessaire à l'étape de fusion des vésicules synaptiques (Humeau et al., 2002).

Enfin, en introduction de mes résultats, je consacrerai un chapitre décrivant le rôle des protéines Rho lors de l'exocytose régulée dans les cellules chromaffines (cf. page 52).

5- Modes de régulation des GTPases Rho

L'état d'activation des GTPases Rho est étroitement régulé par différents facteurs (**Figure 33**). Le passage à l'état actif est contrôlé par les facteurs d'échanges ou GEF pour « Guanine-nucleotide Exchange Factor », et le retour à l'état inactif par les protéines stimulant l'activité GTPasique ou GAP pour « GTPase-Activating Protein ». Le troisième type de protéine régulant l'activité des GTPases est le GDI pour « Guanine-nucleotide Dissociation Inhibitor » qui inhibe la dissociation du GDP. Je décrirai brièvement ici quelques points important sur les GAP et les GDI de Rho puis je me focaliserai sur les GEF qui concernent plus particulièrement mes travaux.

a- Les GEF

(i) Généralités

Les GEF sont divisées en deux familles : la famille à domaine Dbl (Diffuse B-cell Lymphoma) et la famille à domaine CZH (CDM-Zizimin-Homology). Cette dernière n'a été mise en évidence que récemment, elle compte parmi ses membres des protéines comme les protéines CDM (Ced-5, Dock180, Myoblast city) qui activent Rac, et les zizimines qui activent Cdc42 (Meller et al., 2005).

Les GEF de la famille à domaine Dbl ont été beaucoup plus étudiées. Elles possèdent dans leur région C-terminal un domaine appelé DH (« Dbl Homolog ») associé à un domaine PH (Pleckstrin Homology). On compte à l'heure actuelle 69 membres qui sont spécifiques ou non d'une GTPase donnée. Globalement, ces GEF interagissent avec leur domaine DH sur les régions switch 1 et switch 2 des GTPases. Cette interaction désorganise la poche de liaison au nucléotide et obstrue le site de liaison du cofacteur Mg^{2+} . Ceci aboutit au changement de conformation des régions switch et au détachement du GDP. Une molécule de GTP va ensuite se fixer sur la GTPase et déloger le facteur d'échange. Les sites d'interactions peuvent diverger d'une GEF à l'autre.

(ii) Mode de régulation

La régulation des facteurs d'échange est mal comprise, mais certains points sont quand même connus, même s'ils ne permettent pas de mettre en place un modèle de régulation valable pour tous les GEFs.

Etant donnée l'affinité du domaine PH pour certaines phosphoinositides telles que le PI(4,5)P₂, ce domaine intervient dans la localisation du facteur d'échange. Cette hypothèse est confirmée par les travaux de Russo et collaborateurs, qui ont mis en évidence l'importance de l'interaction entre le PI(4,5)P₂ et le domaine PH dans la localisation mais aussi dans l'activité d'échange du GEF Dbl (Russo et al., 2001). De plus, Fleming et collaborateurs ont tiré les mêmes conclusions de leur étude portant sur l'influence de la liaison entre le PI(4,5)P₂ et le domaine PH de Tiam1 (Fleming et al., 2004). Le domaine DH est toujours associé au domaine PH, et il a été démontré que l'activité d'échange du tandem DH-PH est bien plus élevée que celle de DH seul (Rossman and Campbell, 2000), suggérant ainsi un mécanisme de coopération allostérique entre DH et PH.

Des expériences de mutagenèse ont permis de montrer que beaucoup de facteurs d'échange tronqués en N-terminal sont constitutivement actifs, suggérant ainsi le rôle inhibiteur des séquences en amont du domaine DH (Schmidt and Hall, 2002). Certains facteurs d'échange Dbl sont donc en conformation auto-inhibée et nécessitent l'intervention d'une tierce molécule pour être activés. C'est par exemple le cas de l'intersectine-L, qui doit se lier à N-WASP afin de pouvoir exercer son activité d'échange sur Cdc42 (Irie and Yamaguchi, 2002). Sachant que N-WASP est un effecteur de Cdc42, l'intersectine se trouve donc au centre d'une boucle de régulation rétro-active. L'autre mode de régulation connu pour de nombreuses protéines d'échange est la phosphorylation, mais les effets de cette modification sur l'activité des facteurs d'échange sont relativement variables. Dans le cas de Ras-GRF, par exemple, la phosphorylation par Src va activer Rac (Kiyono et al., 2000) alors que celle effectuée par Cdk5 aura pour effet de l'inhiber (Kesavapany et al., 2004).

(iii) Implication des GEF au cours de l'exocytose régulée

A l'heure actuelle, seulement trois facteurs d'échange de Rho ont été identifiés comme jouant un rôle au cours de l'exocytose régulée.

Il y a quelques années, le groupe de Stéphane Gasman, s'est intéressé à l'intersectine 1L, un facteur d'échange jusque là impliqué dans les processus d'endocytose. Un épissage alternatif aboutit à la formation de deux isoformes de tailles différentes, l'intersectine 1L

(long) et l'intersectine 1S (short). Seule l'intersectine 1L possède les domaines DH-PH et son activité GEF est spécifique pour Cdc42 (Guipponi et al., 1998). Cette protéine présente une structure modulaire comprenant une région C-terminale responsable de l'activité d'échange *via* les domaines DH-PH, des domaines EH, des domaines coiled coil et des domaines SH3 responsables de l'interaction avec différents partenaires dont la SNAP-25, la dynamine et N-WASP (Okamoto et al., 1999). Les travaux de Malacombe et collaborateurs, au laboratoire, montrent la présence de l'intersectine-1L au niveau des sites d'exocytose des cellules PC12 et chromaffines. De plus, l'inactivation génique de l'intersectine par ARN interférents inhibe drastiquement la sécrétion dans les cellules PC12 en empêchant l'activation de Cdc42 nécessaire au cours de ce processus (Malacombe et al., 2006b). Ces travaux identifiaient formellement l'intersectine-1L en tant que facteur d'échange de Cdc 42 et étendaient son rôle aux processus d'exocytose.

Trio et Kalirin sont des protéines en association sous forme de complexe. Ces deux protéines possèdent des domaines GEF, un domaine SH3 et un domaine kinase. Une étude suggère l'importance de leur activité GEF au cours de la maturation des granules de sécrétion dans des cellules neuroendocrines. En effet, la surexpression du domaine GEF de ces protéines aboutit à une augmentation de la sécrétion de granule immature tandis que l'inhibition de leur activité GEF inhibe la voie de sécrétion constitutive. Les auteurs proposent que ces facteurs d'échange puissent intervenir afin de favoriser la sécrétion constitutive des granules immatures et de réguler ainsi la voie de sécrétion (Ferraro et al., 2007). Une autre étude met en évidence l'importance de Trio au cours de la sécrétion. Les auteurs proposent un modèle selon lequel l'activation de Rac par Trio (lui-même activé via sa phosphorylation par la kinase Cdk5) stimule l'exocytose dans les cellules hypophysaires. (Xin et al., 2004).

Enfin, une dernière étude, réalisée en collaboration avec l'équipe de Nicolas Vitale, suggère l'implication du complexe β Pix/Scribble au cours de l'exocytose régulée dans les cellules PLC12. β PIX est un membre de la famille des protéines PIX (PAK-interacting exchange factor) aussi appelées Cool (cloned out of library) (Bagrodia et al., 1998). β 1PIX-a peut être exprimée sous une forme longue de 85 kDa et une forme courte de 50 kDa. Il possède un domaine SH3, un domaine DH-PH qui catalyse l'échange nucléotidique sur Rac et Cdc42, un domaine GB permettant l'interaction avec les protéines GIT et un domaine leucine zipper impliqué dans l'homodimérisation de PIX. PIX présente une activité GEF pour Rac et Cdc42 *in vitro* et *in vivo* et joue un rôle dans la motilité cellulaire et la formation de neurites *in vitro* (Shin et al., 2006 ; Manser et al., 1998). La protéine β PIX est présente dans le

cytoplasme des cellules PC12 au repos, mais une stimulation déclenche sa re-localisation partielle à la membrane plasmique (Audebert et al., 2004). Cette redistribution de β -PIX fait intervenir le facteur suppresseur de tumeur hScrib présent à la membrane plasmique. L'extrémité carboxy-terminale de β -PIX interagit directement avec les domaines PDZ de hScrib (Audebert et al., 2004). Par la transfection de mutants, les auteurs montrent que la redistribution et l'activité GEF de β -PIX semblent nécessaires à l'exocytose.

b- Les GAP

Les protéines activatrices GAP vont inactiver les GTPases en accélérant la vitesse d'hydrolyse du GTP en GDP + Pi. Leur seul domaine commun est le domaine catalytique GAP d'environ 330 acides aminés (Bernards, 2003). Le domaine GAP se lie aux régions switch, stabilise l'interaction entre la GTPase et une molécule d'eau ce qui va favoriser son activité GTPasique (Moon and Zheng, 2003). Les GAP sont elles-mêmes régulées par des mécanismes aussi divers que l'interaction protéine/protéine, la phosphorylation, l'interaction avec des phospholipides, la dégradation protéolytique ou encore la translocation (Moon and Zheng, 2003).

La régulation des GAP est importante et peut modifier le choix de la GTPase à inactiver: c'est le cas de p190RhoGAP. En effet, le phosphatidylsérine inhibe l'activité de p190 sur Rho et stimule celle de p190 sur Rac, permettant ainsi de passer d'une GTPase à l'autre en fonction de l'environnement lipidique (Ligeti et al., 2004). Certaines GAP possèdent d'autres domaines comme des domaines SH2, SH3, PH ou CR ce qui suggère qu'elles possèdent d'autres activités catalytiques en dehors de leur activité GAP (Moon and Zheng, 2003).

c- Les GDI

Les deux principaux rôles de cette famille de régulateur est de servir de chaperonnes au GTPase en les séquestrant lorsqu'elles sont liées au GDP et de réguler leur adressage et leur localisation (Dovas and Couchman, 2005). Contrairement au GEF et au GAP, il n'y a que trois RhoGDI mis en évidence chez les mammifères (Dransart et al., 2005).

L'interaction entre le GDI et la GTPase se fait dans les parties terminales des protéines, seulement si la GTPase possède un groupement géranylgeranyl ou farnésyl en C-terminal. La partie C-terminale des GDI lie l'extrémité C-terminale de la GTPase et reconnaît la région switch II, tandis que la région N-terminale peut interagir avec les deux régions switch. Il semblerait que la partie N-terminale des RhoGDI soit responsable de la fonction de

stabilisation de la GTPase sous sa forme liée au GDP ; leur rôle ne serait pas d'inhiber la dissociation entre le GDP et la protéine G à proprement parler mais plutôt d'empêcher la liaison du facteur d'échange. Le site de liaison du GEF est le même que celui du GDI, et la dissociation du GDI avec la GTPase est un pré-requis à l'activation de la protéine G par son GEF (Robbe et al., 2003).

Après avoir fait connaissance avec les GTPases de la famille Rho, leur régulation et leur mode d'action, je vais entrer dans le vif du sujet et aborder une question qui préoccupe le laboratoire depuis de nombreuses années : quels est le rôle des GTPases Rho au cours de l'exocytose régulée dans les cellules chromaffines ?

II- Rôles des GTPases Rho au cours de l'exocytose régulée dans les cellules chromaffines

Depuis plusieurs années, le groupe de Stéphane Gasman étudie le rôle des GTPases Rho au cours de l'exocytose régulée dans les cellules neuroendocrines. A mon arrivée en doctorat fin 2005, l'état d'avancement de leurs données permettait de proposer deux mécanismes potentiels par lesquels RhoA et Cdc42 interviendraient. En effet, ces deux GTPases semblent réguler l'organisation du cytosquelette d'actine au cours de l'exocytose. J'aimerais ici faire un bref rappel historique de ces données obtenues au laboratoire et vous décrire le contexte dans lequel nous avons décidé de travailler sur la voie moléculaire faisant intervenir Rac.

A- RhoA et Cdc42 : contrôle de la dynamique de l'actine

1- Le rôle de RhoA

L'histoire des Rho dans l'exocytose régulée des cellules chromaffines a commencé en 1997 quand Stéphane Gasman cherchait à mettre en évidence le mécanisme effecteur de la protéine Go. L'activation de cette protéine G hétérotrimérique, localisée sur la membrane des granules de sécrétion, inhibe l'exocytose (Vitale et al., 1993). C'est en montrant que cette inhibition était dépendante de l'état d'organisation du réseau d'actine, que Stéphane Gasman orienta ses recherches vers les protéines de type Rho. De façon intéressante, les travaux de

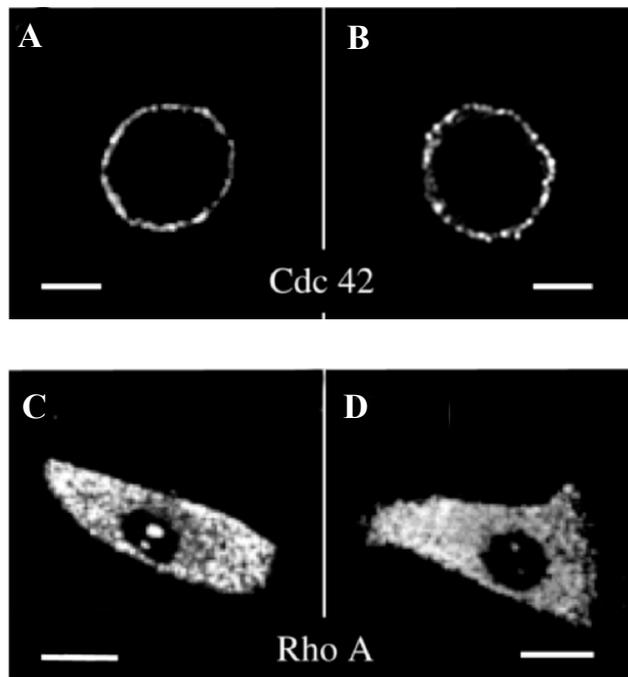


Figure 34 : Distribution intracellulaire des protéines Cdc42 et RhoA dans des cellules chromaffines. Cdc42 est localisé dans la région subplasmalemale (A, B) et RhoA se situe au niveau des granules de sécrétion (C, D). La localisation des GTPases ne varie pas que les cellules soient stimulées (10 μ M de nicotine (B, D) ou non (AC). D'après Gasman et al., 1999.

Gasman et collaborateurs montrent qu'un traitement des cellules chromaffines avec la toxine C3 de *Clostridium botulinum*, empêche l'effet inhibiteur de Go démontrant l'implication de RhoA dans la cascade régulée par Go (Gasman et al., 1997). Dans une deuxième étude, les auteurs ont montré que RhoA est localisée à la membrane des granules de sécrétion (**Figure 34**) et qu'elle active, la phosphatidylinositolphosphate 4-Kinase (Gasman et al., 1998). L'hypothèse avancée est que Go active RhoA qui elle-même active la PI4-kinase pour aboutir, *in fine*, à la formation de PI(4,5)P₂ si l'on considère l'action, en aval, de la phosphatidylinositol-5 kinase. Le PI(4,5)P₂ participerait au maintien de la barrière d'actine en inhibant l'activité des protéines de fragmentation telles que la scindérine ou la gelsoline connues pour participer à la déstructuration de la barrière d'actine dans les cellules chromaffines (Trifaro et al., 2000).

2- Rôle de Cdc42

Contrairement à RhoA, Cdc42 est localisée au niveau de la membrane plasmique (**Figure 34**) et semble avoir un rôle actif au cours de l'exocytose (Gasman et al., 1999a) ; (Gasman et al., 2004). En effet, la stimulation des cellules PC12 entraîne l'activation spécifique de Cdc42. De plus l'expression du mutant constitutivement actif Cdc42^{Q61} stimule la libération hormonale dans les cellules PC12. En explorant la voie effectrice de Cdc42, Stéphane Gasman et collaborateurs démontrent que Cdc42 recrute et active N-WASP pour permettre la synthèse *de novo* d'actine nécessaire aux étapes tardives, via le complexe Arp2/3 localisé sur les granules de sécrétion (Gasman et al., 2004). Deux ans plus tard, toujours au laboratoire, les travaux de Magali Malacombe ont confirmé l'implication de Cdc42 au cours de ce processus par l'utilisation de d'ARN interférence (Malacombe et al., 2006b). A ce jour, le rôle précis des filaments d'actine néo-synthétisés sous l'action de Cdc42 reste à déterminer.

B- Quel rôle pour Rac ?

1- Etat des lieux des données

Lorsque j'ai débuté mon doctorat, l'implication de Rac1 au cours du processus d'exocytose régulée avait déjà été suggérée dans les neurones, cellules β pancréatiques et les cellules immunitaires (cf. page 47).

Dans les cellules chromaffines, les travaux préliminaires de Stéphane Gasman, montraient la présence de Rac1 au niveau de la membrane plasmique (Gasman et al., 1999a).

Quelques années plus tard, deux études réalisées respectivement par le groupe de E. Stuenkel et de R. Regazzi, montraient l'implication de Rac au cours de l'exocytose régulée dans les cellules chromaffines et PC12. Bien qu'utilisant, toutes deux, la surexpression de mutants de Rac1 constitutivement actifs (Rac1^{L61} ou Rac1^{V12}), ces deux études n'arrivent pas à la même conclusion. Dans la première, l'expression de Rac actif aboutit à une augmentation de l'exocytose alors que la transfection du dominant négatif n'a pas d'effet sur la sécrétion (Li et al., 2003b). Dans la seconde, l'effet inverse est obtenu puisque c'est l'expression du mutant dominant négatif qui stimule la sécrétion (Frantz et al., 2002).

Les choses n'étaient donc pas claires et c'est dans ce contexte que j'ai débuté mon projet de thèse. Dans un premier temps, j'ai cherché à confirmer l'implication de Rac1 au cours de l'exocytose régulée. Dans ce but, nous avons opté pour une stratégie d'inactivation de Rac par ARN interférence en utilisant la technique des « small hairpin » ARN (shRNA ; cf. matériels et méthodes).

La question suivante s'imposait logiquement : si Rac1 agit au cours de ce processus, quel est son rôle ? Autrement dit, parmi les nombreux effecteurs de cette GTPase, lequel est important pour ce mécanisme ? Est-ce l'actine comme dans le cas de RhoA ou Cdc42 ? Ou bien l'action de Rac1 passe-t-elle par une toute autre voie ? La phospholipase D nous est apparue comme un candidat de choix pour la fonction d'effecteur de Rac1 lors de l'exocytose et ce pour plusieurs raisons : 1) certaines protéines Rho dont Rac1 sont capables d'activer la PLD *in vitro* (Exton, 1999). 2) les travaux réalisés dans notre laboratoire par le groupe de Nicolas Vitale montrent clairement l'importance de la phospholipase D1 au cours des phases tardives de l'exocytose (cf. page 39). 3) enfin, l'expression d'un mutant PLD1 inactivable par les GTPase Rho (PLD^{I870R}) inhibe l'activité sécrétrice des cellules PC12 (Nicolas Vitale communication personnelle). L'ensemble de ces observations suggérait clairement l'importance des GTPases Rho dans la régulation de la PLD. Afin de tester cette hypothèse, nous avons choisi d'effectuer des mesures d'activité PLD dans des cellules PC12 dont l'expression de RhoA, Rac1 ou de Cdc42 était diminuée par ARN interférent.

Pour finir, je me suis penchée sur la question du mode d'activation de cette GTPase. A l'heure actuelle, Trio et β Pix sont les deux seuls facteurs d'échange de Rac1 impliqués au cours du processus d'exocytose régulée (cf. page 50). Les résultats obtenus par le groupe de Jean-Paul Borg en collaboration avec Nicolas Vitale sont des plus intéressants car ils montrent que la stimulation des cellules PC12 provoque le recrutement de β Pix à la membrane plasmique où il interagit avec hScrib (Audebert et al., 2004). Dans ce troisième

volet, j'ai étudié l'implication fonctionnelle de β Pix et de hScrib au cours de l'exocytose par une approche d'ARN interférence. En parallèle, j'ai cherché à savoir si β Pix pouvait être le facteur d'échange de Rac dans l'exocytose régulée.

Ainsi, au cours de ce travail, je me suis efforcée d'étudier le lien potentiel entre β Pix, Rac et la PLD1 au cours du processus d'exocytose régulée dans les cellules PC12. D'un point de vue technique, j'ai mesuré de façon quantitative l'activité sécrétrice des cellules PC12 par le test de sécrétion de l'hormone de croissance (cf. matériels et méthodes). J'ai également réalisé des tests biochimiques de mesure des activités Rac et PLD. Enfin, j'ai utilisé une approche d'immunofluorescence couplée à la microscopie confocale afin de déterminer la localisation ou le recrutement des différents partenaires.

Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe de Nicolas Vitale. Le clonage des constructions codant pour les ARN interférence de β Pix et Scribble ainsi que leur effet sur l'activité sécrétrice ont été réalisés par Etienne Lonchamps.

2- Publication 1: « β PIX-activated Rac1 stimulates the activation of phospholipase D, which is associated with exocytosis in neuroendocrine cells »

Fanny Momboisse, Etienne Lonchamp, Valerie Calco, Mara Ceridono, Nicolas Vitale,
Marie-France Bader and Stéphane Gasman

J Cell Sci. 2009 Mar 15;122(Pt 6):798-806.

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de Documentation

β PIX-activated Rac1 stimulates the activation of phospholipase D, which is associated with exocytosis in neuroendocrine cells

Fanny MOMBOISSE, Etienne LONCHAMP, Valerie CALCO, Mara CERIDONO, Nicolas VITALE, Marie-France BADER and Stéphane GASMAN

Journal of Cell Science, 2009, vol. 122, pages 798-806

Pages 56-... :

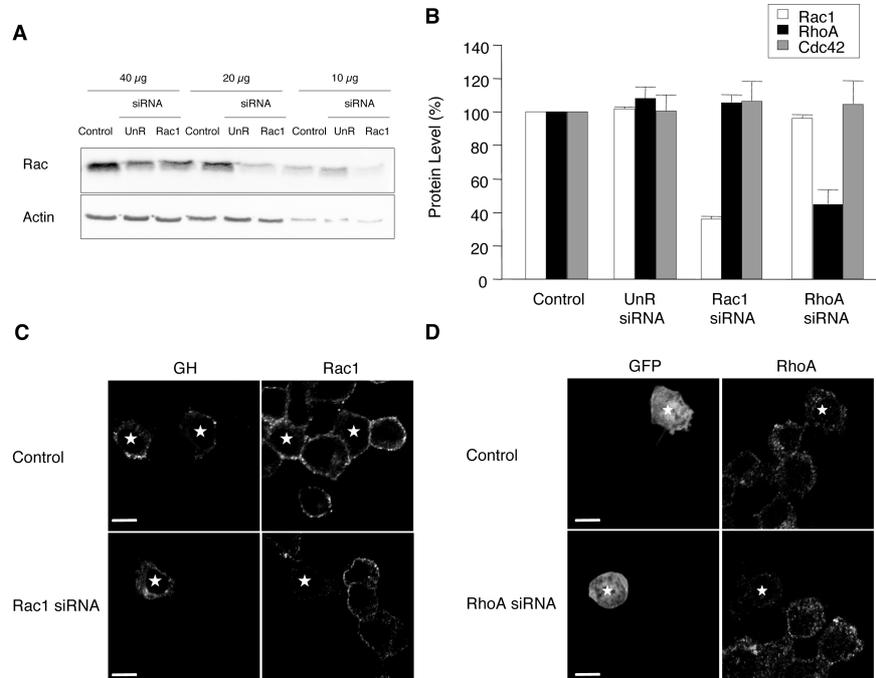
La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1242/jcs.038109>

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

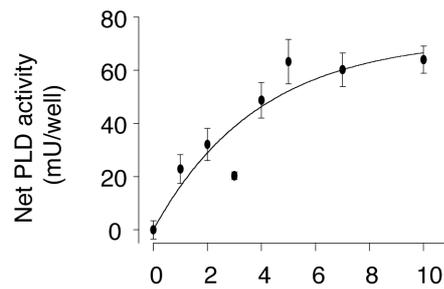
<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>



Supplementary figure 1. Silencing efficiency of the RhoA and Rac1 siRNAs

(A) Cells were transfected with the pGHSuper vector (Control), pGHSuper-UnR siRNA or with pGHSuper-Rac1 siRNA. After 72h, transfected cells were lysed and aliquot containing the indicated proteins concentrations were used for electrophoresis and Western-blot analysis using antibodies against Rac1 and actin **(B)** Histogram illustrating a semi-quantitative analysis of the expression level of endogenous RhoA, Rac1 and Cdc42 in PC12 cells expressing GH (Control), unrelated siRNAs (UnR), or siRNAs against RhoA or Rac1. Values are obtained by scanning densitometry analysis of the Western-blot obtained with 20 µg of proteins. Each protein level has been normalized according to the actin level and data are given as the mean values \pm SD (n=3). **(C)** Cells were transfected with the pGHSuper vector (Control) or with pGHSuper-Rac1 siRNA. After 72h, cells were fixed and stained with monoclonal anti-Rac1 and polyclonal anti-GH antibodies visualized with Alexa 555-and Alexa 488-conjugated secondary antibodies respectively. Transfected cells are indicated with an asterisk. Bar. 5 µm. **(D)** Transfected cells with the pEGFP vector (Control) or pEGFP-RhoA siRNA vector were processed for immunofluorescence using monoclonal anti-RhoA antibodies visualized with Alexa 555-conjugated secondary antibodies. Transfected cells are indicated with an asterisk. Bar. 5 µm.

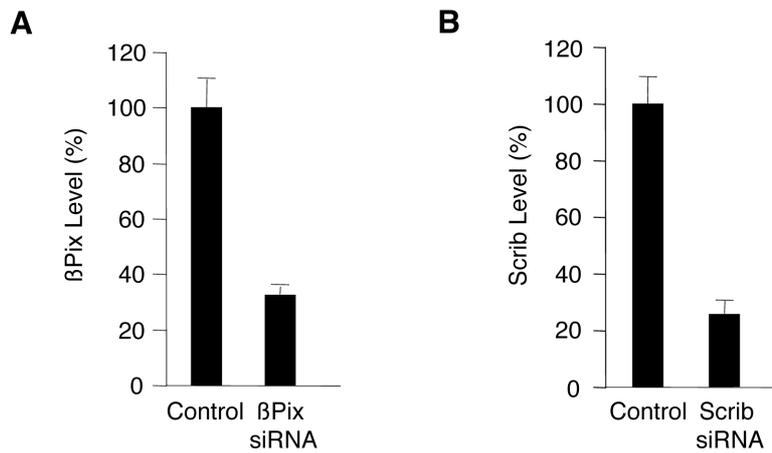
Supplementary Figure 1 Momboisse et al



Supplementary Figure 2. Time course of PLD1 activation.

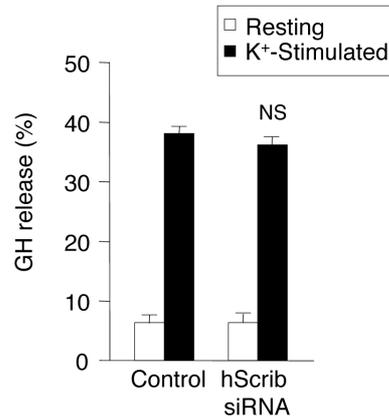
PC12 cells were washed twice with calcium-free Locke's solution, stimulated for various period of time with 59 mM K^+ and then processed for PLD activity assay. K^+ -evoked PLD activity is obtained by subtracting the PLD activity detected in cells maintained in calcium-free Locke's solution from the PLD activity measured in the K^+ -stimulated cells. $n=3$.

Supplementary Figure 2 *Momboisse et al*



Supplementary Figure 3. Silencing efficiency of the β Pix and Scrib siRNAs. Protein levels from PC12 cells expressing siRNA against β Pix (A) or Scrib (B) were calculated from densitometry analysis of the corresponding Western-blot and normalized according to the actin level. Data are given as the mean values \pm SD obtained in three independent experiments.

Supplementary Figure 3 *Momboisse et al*



Supplementary Figure 4. Effect of human Scrib siRNA on GH secretion.

PC12 cells were transfected with the pGHsuper vector (Control) or with pGHsuper-hScrib siRNA for 48h. Cells were incubated for 10 min in Locke's solution (Resting) or stimulated for 10 min with 59 mM K⁺ (K⁺-stimulated). GH secreted into the medium and retained in the cells was then estimated by an ELISA assay. GH release is expressed as the percentage of total GH present in the cells before the 10 min stimulation period. n = 3; NS (not significant) compared to control cells (ANOVA).

Supplementary Figure 4 *Momboisse et al*

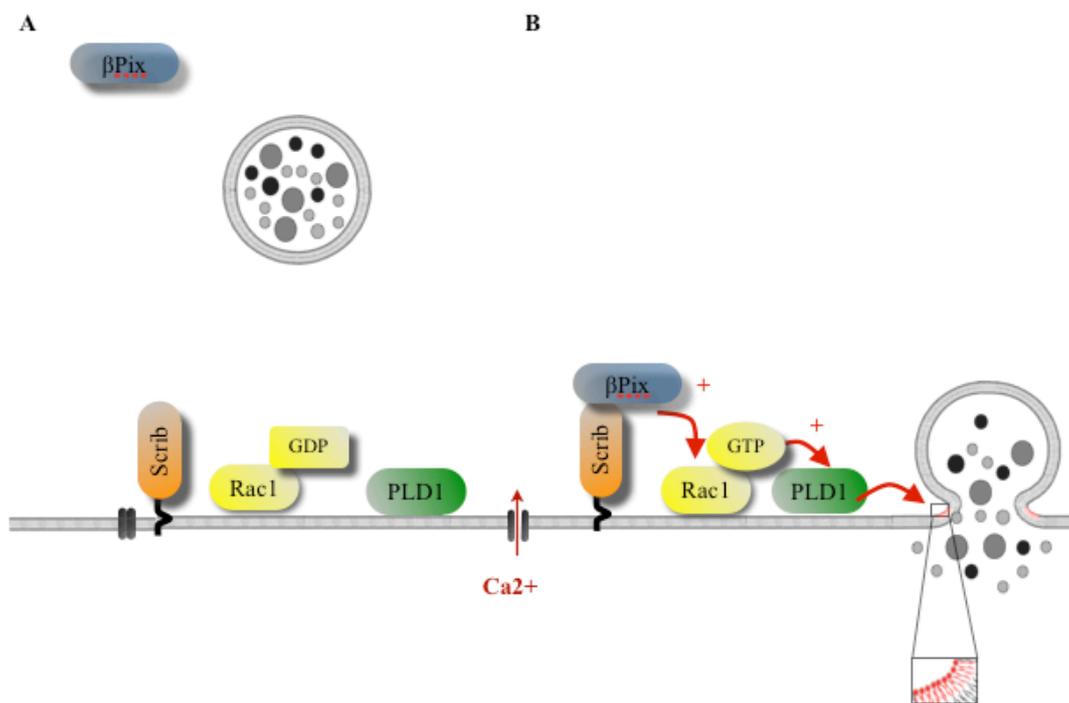


Figure 35: Schéma général regroupant l'ensemble des données obtenues au cours de la publication 1. A- Le facteur d'échange β Pix est localisé dans le cytoplasme dans les cellules au repos. B- Après stimulation des cellules, β Pix est recruté à la membrane plasmique par Scrib et active, la voie Rac1/PLD1 ce qui va aboutir à la formation de domaines de PA (en rouge) permettant la formation de courbures de membranes nécessaire à la fusion du granule à la membrane plasmique.

3- Discussion des résultats obtenus et perspectives

L'ensemble de ces résultats confirme un rôle positif de la GTPase Rac1 au cours de l'exocytose régulée et établit l'existence d'une régulation fine de la production d'acide phosphatidique au cours de l'exocytose dans les cellules neuroendocrines par une cascade moléculaire impliquant β Pix, Rac1 et la PLD1 (**Figure 35**). De façon intéressante, ces données mettent en lumière, pour la première fois, un lien entre Rac et la fusion membranaire *via* la production de PA au niveau de la membrane plasmique. Cependant nombreuses questions restent en suspens et dans les paragraphes suivants, je vais aborder certains points qui me semblent intéressants.

a- Rac1 et l'actine ?

La question de la régulation du cytosquelette d'actine se pose logiquement lorsque nous abordons le rôle d'une GTPase Rho dans un processus cellulaire donné. L'étude de Li et collaborateur suggère un rôle de Rac1 dans la régulation du cytosquelette d'actine *via* l'activation de la kinase PAK (Li et al., 2003b). A l'inverse, nos résultats laissent à penser que Rac1 n'intervient pas dans la régulation du cytosquelette d'actine (publication 1) et que PAK n'est pas impliquée au cours de l'exocytose régulée dans les cellules PC12 (Gasman et al., 2004). Une comparaison entre les deux études est intéressante à faire.

Tout d'abord, nous n'observons pas exactement la même localisation de Rac1. Dans leur cas, Rac1 est principalement cytosolique tandis que nous observons au contraire un enrichissement dans la région subplasmale des cellules PC12 et chromaffines.

Au cours de ces études, le marquage de l'actine se fait par l'utilisation de phalloïdine couplée à la rhodamine. Cette toxine lie préférentiellement l'actine sous forme filamenteuse. L'effet qu'ils observent sur le cytosquelette à l'aide de ce type de marquage après stimulation des cellules apparaît différent du notre. Dans les deux cas, lorsque les cellules sont au repos, le marquage de l'actine est périphérique. Après stimulation, nous observons une forte diminution du marquage traduisant une dépolymérisation du cytosquelette (**Figure 36 A**). Des études de microscopie électronique vont également dans ce sens (Tchakarov et al., 1998) et nous retrouvons ce type de marquage dans les cellules PC12 (**Figure 37**). Dans l'étude de Li et collaborateur, la stimulation n'induit qu'une légère diminution du marquage de l'actine périphérique et entraîne une accumulation du marquage phalloïdine dans le cytoplasme

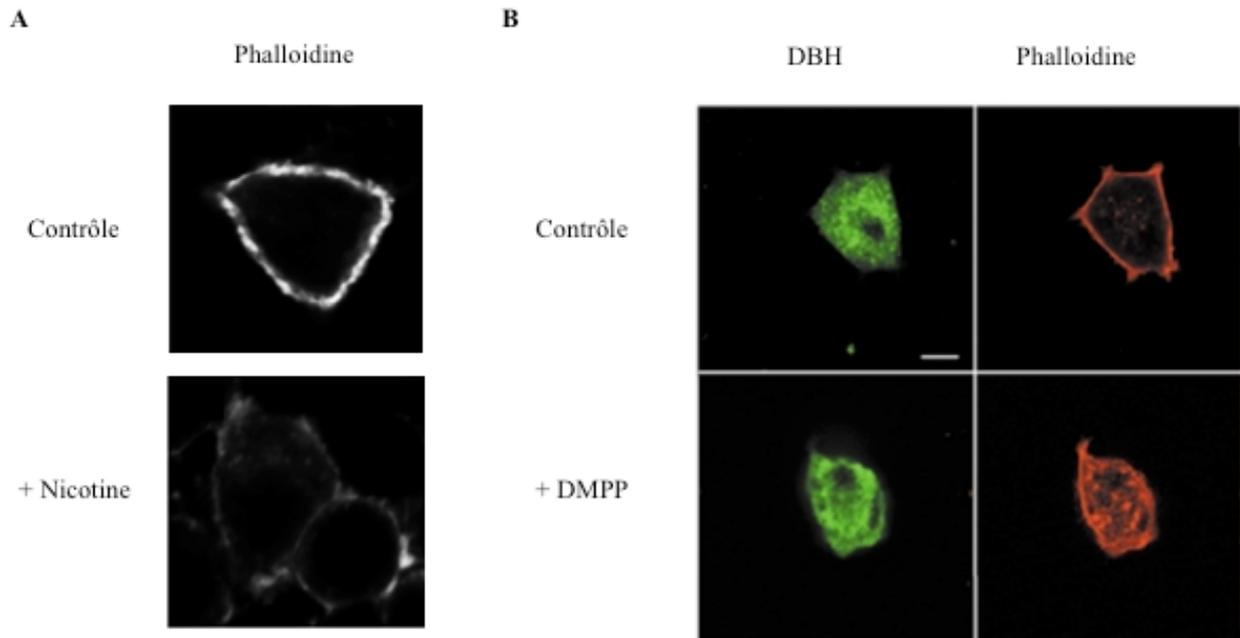


Figure 36: Comparaison du marquage de l'actine par la phalloïdine-rhodamine sur des cellules chromaffines bovines au cours de deux études différentes. D'après Li et al., 2003b, nos résultats non publiés.

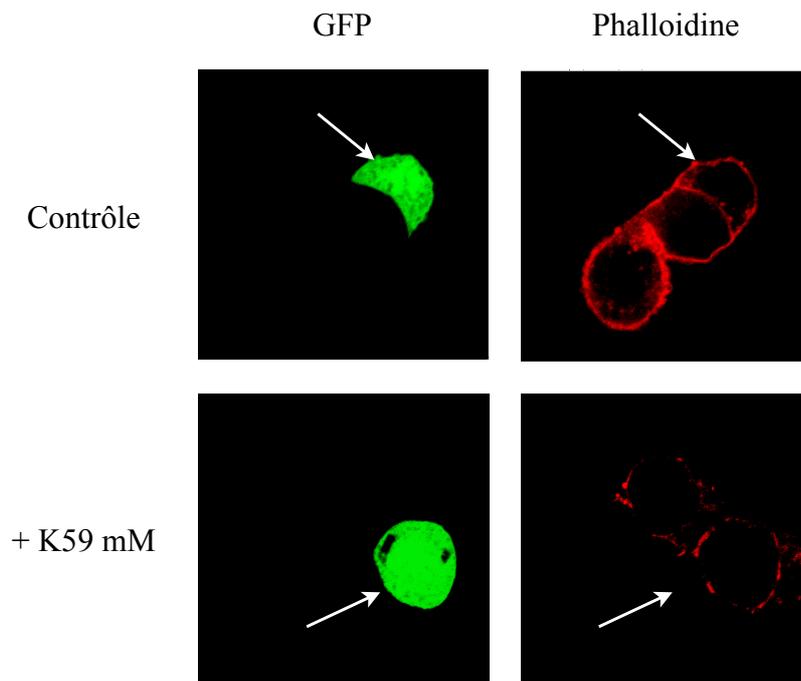


Figure 37: Effet de l'expression de l'ARN interférent Rac sur le cortex d'actine dans les cellules PC12. Les cellules PC12 ont été transfectées par un le plasmide pEGFP-ARN interférent Rac1 puis incubées 10 minutes dans une solution de potassium dépolarisante (K^+59 mM). Après fixation et perméabilisation des cellules, un marquage à la Phalloïdine-Rhodamine est effectué. Les cellules transfectées sont indiquées par les flèches.

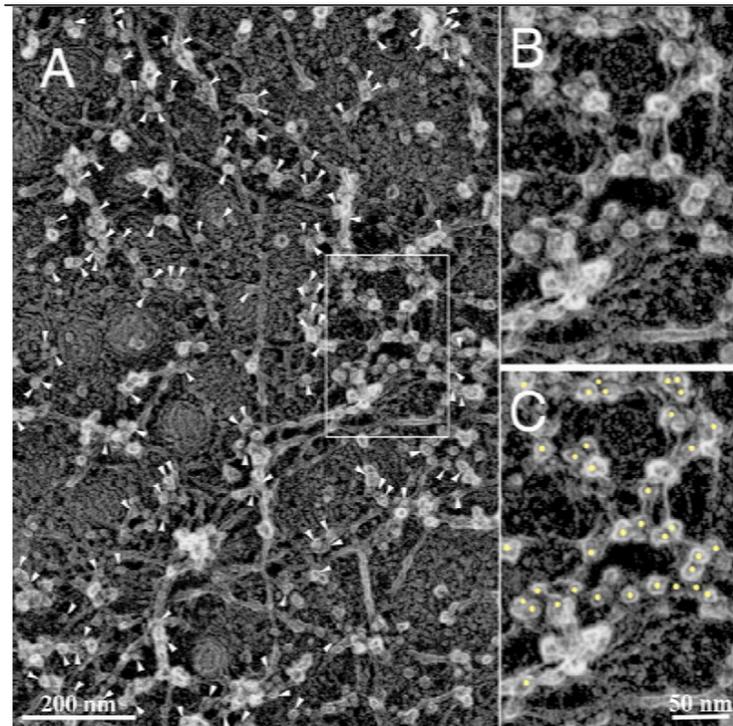


Figure 38: Le cytosquelette d'actine vu par tomographie. A: les filaments d'actine sont marqués indirectement avec des billes d'or couplées à l'anticorps secondaire reconnaissant l'anticorps anti-actine (flèches). B- Grossissement du cadre représenté en A. C- Les billes d'or ayant servi à marquer les filaments d'actine sont représentées par un point jaune. D'après Morone et al., 2006.

(Figure 36 B). Nous observons parfois une légère relocalisation de courts filaments dans le cytoplasme des cellules chromaffines stimulées, mais de façon moins importante.

L'utilisation du mutant constitutivement actif de Rac1 pose un problème majeur. Son expression dans les cellules chromaffines et PC12 entraîne une modification de l'organisation du cytosquelette d'actine provoquant un important changement de la morphologie cellulaire (Li et al., 2003b, nos résultats non publiés). Dans ce contexte il est difficile de conclure sur l'effet de Rac1 sur le remodelage de l'actine nécessaire à l'exocytose. Afin de pallier ce problème, j'ai effectué des marquages de l'actine en exprimant dans les cellules des ARN interférents dirigés contre la séquence d'ARNm de Rac1. Dans ces conditions, je n'observe pas de changement du marquage du cytosquelette, ni dans les conditions de repos, ni après stimulation des cellules par rapport aux cellules contrôles (**Figure 37**). Couplés avec les résultats obtenus par Stéphane Gasman en 1999 (Gasman et al., 1999a), ces résultats suggèrent que la GTPase Rac1 n'est pas impliqué dans la réorganisation du cytosquelette d'actine induite au cours de l'exocytose régulée des cellules neuroendocrines. Cependant, même en utilisant la microscopie confocale, la résolution est insuffisante pour visualiser les régulations fines du cytosquelette qui ont lieu après stimulation de l'exocytose. Ces données méritent d'être expérimentées par une approche permettant d'accéder à l'ultra-structure de l'actine.

L'utilisation de la tomographie, par exemple, pourrait être un outil intéressant pour vérifier notre hypothèse. Cette technique est basée sur l'acquisition en microscopie électronique d'une série d'inclinaisons d'un objet biologique. La combinaison de ces images permet alors d'obtenir une reconstitution tridimensionnelle des volumes d'organelles ou de filaments subcellulaires. De façon intéressante, cette technique a été appliquée avec succès pour mettre en évidence l'organisation des filaments d'actine dans des fibroblastes (**Figure 38**) (Morone et al., 2006).

b- Un rôle de Rac1 seulement dans les phases tardives de l'exocytose ?

Les travaux menés par le groupe de Nicolas Vitale dans notre laboratoire proposent un rôle de la PLD1 dans la formation d'acide phosphatidique (PA) au site d'exocytose. Le PA participerait à la création des sites fusiogéniques en facilitant les courbures de membranes. Il est intéressant de noter que l'addition dans le milieu extracellulaire d'un lipide à cône inversé, le lysophosphatidylcholine (LPC), restaure l'effet inhibiteur de l'ARN interférent, bloquant l'expression de la PLD1. Ce résultat suggère que la PLD1 ne possède pas d'autre fonction au cours de l'exocytose (Zeniou-Meyer et al., 2007).

La même expérience pourrait être réalisée dans des cellules PC12 dont l'expression de Rac1 est diminuée par ARN interférent. Si le LPC ne restaure pas complètement l'activité sécrétrice dans ces cellules, nous pourrions conclure que l'action de Rac1 ne se cantonne pas à l'activation de la PLD. Dans ce cas, il serait intéressant d'identifier les autres effecteurs de Rac1. Parmi les nombreux effecteurs, les phosphatidylinositol kinases sont particulièrement intéressantes. Le traitement des cellules chromaffines avec un inhibiteur de la PI-3kinase aboutit à une inhibition de la sécrétion de catécholamine (Chasserot-Golaz et al., 1998). L'implication spécifique de l'isoforme C2 α de cette enzyme, a été démontrée au cours des étapes d'amorçage dans les cellules chromaffines (Meunier et al., 2005). De plus, Rac1 étant également un régulateur des PIP5K, nous ne pouvons pas exclure son implication dans la production de PI(4,5)P₂ nécessaire à l'exocytose. Afin de vérifier cette hypothèse, le niveau de PI(4,5)P₂ pourrait être mesuré dans des cellules PC12 dont l'expression de Rac1 est réduite.

c- Rac1-ARF6-RSK2 : comment y voir plus clair ?

Si l'on fait la synthèse des travaux obtenus au laboratoire, nous constatons que la PLD1 est régulée par différents acteurs.

Tout d'abord, parlons de la GTPase ARF6. Localisée au niveau de la membrane des granules, ARF6 est inactive dans les cellules au repos (Vitale et al., 2002a). La stimulation de l'exocytose, entraîne son activation par son facteur d'échange ARNO au niveau des sites d'exocytose de la membrane plasmique (Vitale et al., 2002b). ARF6 va ensuite interagir avec la PLD1 et stimuler son activité pour synthétiser du PA nécessaire aux phases finales de l'exocytose (Béglé et al., 2009; Zeniou-Meyer et al., 2007). Enfin, une fois le processus terminé, GIT1, une GAP d'ARF6, va faciliter son activation (Meyer et al., 2006). Cette GTPase ne semble pas posséder d'autres effecteurs au cours de l'exocytose régulée (Béglé et al., 2009).

A ce schéma, nous devons désormais ajouter la cascade d'activation Scribble- β Pix-Rac-PLD1. Donnée intéressante : GIT1 est associée à β Pix sous forme de complexe et recrutée à la membrane plasmique par Scribble dans les cellules PC12 (Audebert et al., 2004). Nous nous retrouvons donc dans une configuration où une GEF et une GAP sont présentes dans un même complexe et vont réguler l'activité de deux GTPases activant le même effecteur.

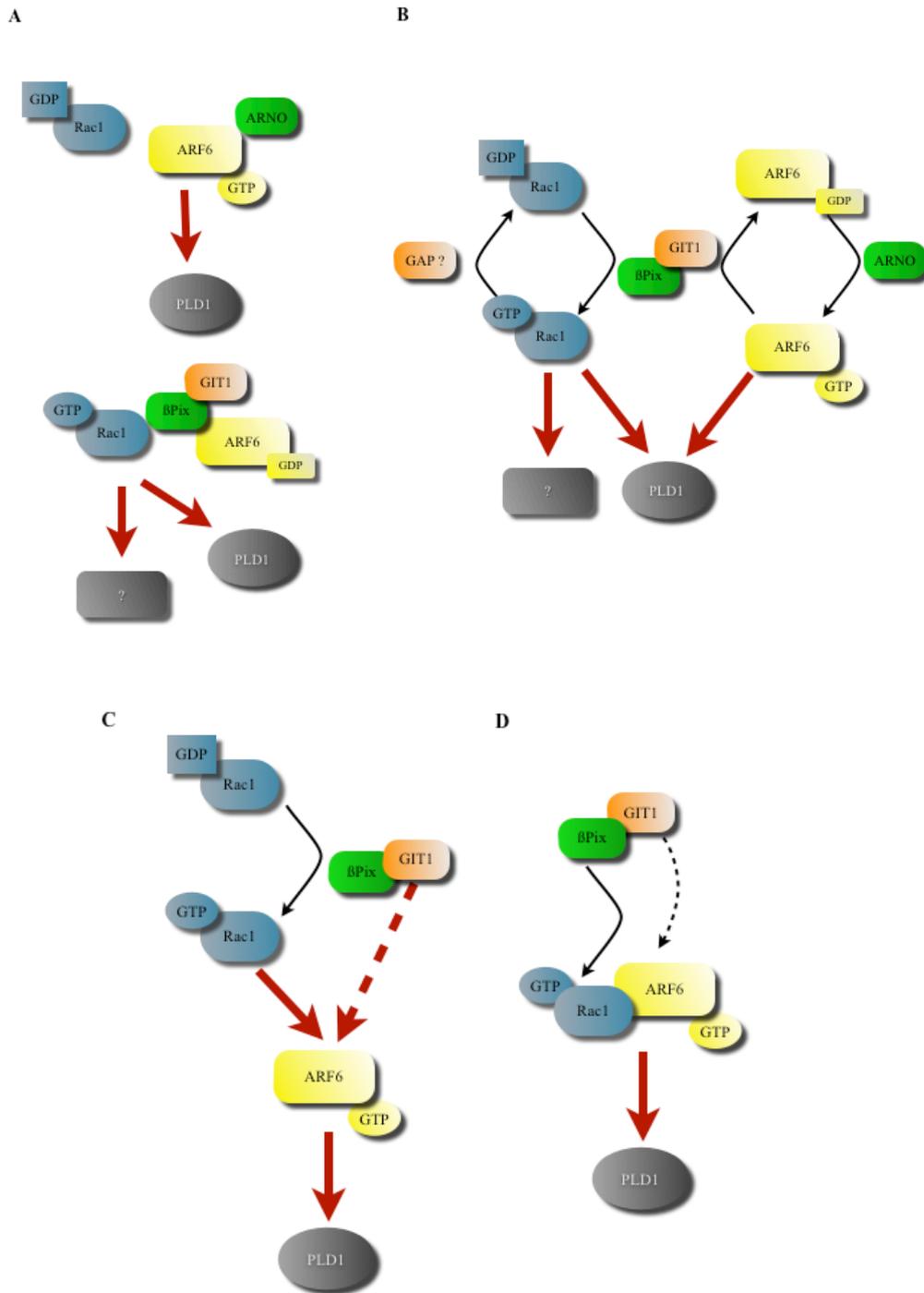


Figure 39: Représentation schématique de quatre hypothèses pouvant expliquer la régulation de l'activité de la PLD1 par les GTPases Rac1 et ARF6 au cours de l'exocytose régulée. A- Activation séquentielle. B- Activation cyclique. C-Activation indirecte. D- Activation synergique.

Différents scénarios peuvent être imaginés afin d'expliquer de tels résultats, j'aimerais proposer ici à quatre hypothèses de fonctionnement :

⇒ une activation séquentielle des deux GTPases (**Figure 39 A**) : une fois activée par ARNO, ARF6 active la PLD1. Le complexe β Pix-GIT1 est ensuite recruté à la membrane, permettant ainsi l'activation de Rac1 et l'inactivation d'ARF6. Rac1 active alors à son tour la PLD1. Dans l'hypothèse où Rac1 possède d'autres effecteurs, ce modèle pourrait avoir un intérêt pour la cellule car tout en permettant une activation continue de la PLD1, Rac1 pourraient activer d'autres effecteurs nécessaires à des étapes plus tardives de l'exocytose.

⇒ une activation cyclique des deux GTPases (**Figure 39 B**) : il est possible d'imaginer qu'ARF6 et Rac1 subissent des cycles rapides d'activation/inactivation étant donné la présence dans un même environnement des GAP et GEF des deux GTPases (la GAP de Rac1 dans ce contexte reste à définir). Dans la même hypothèse d'effecteurs supplémentaires pour Rac1, ceci permettrait une activation continue de la PLD1 et une activation cyclique des autres effecteurs. Ce type d'activation cyclique a déjà été suggéré notamment pour les GTPases Rac1 et Cdc42 au cours de la croissance neuritique par des expériences de FRET (Aoki et al., 2004).

⇒ une activation indirecte de Rac1 sur l'activation de la PLD1 (**Figure 39 C**) : nos résultats ne nous permettent pas de déterminer si l'activation de Rac1 sur la PLD1 s'effectue de manière directe ou indirecte. Il est possible que Rac1-GTP permette l'activation d'ARF6 qui activerait ensuite la PLD1. Jusqu'à présent, les études suggérant des interactions entre les GTPase ARF6 et Rac1, proposent qu'ARF6 est capable d'activer Rac1, l'inverse n'a jamais été montré (Santy and Casanova, 2001).

⇒ une activation synergique des deux GTPases (**Figure 39 D**) : l'action simultanée des deux GTPases permettrait une activation plus soutenue de la PLD1. Des études *in vitro* semblent indiquer que l'activation de la PLD1 est beaucoup plus importante en présence de plusieurs régulateurs. Par exemple, l'effet stimulateur de ARF1 sur l'activité de la PLD1 est entre 3 et 4 fois plus importante en présence des GTPase RhoA, Cdc42 ou Rac (Hammond et al., 1997; Hodgkin et al., 1999)

En utilisant la technique de FRET, Aurélie Béglé a démontré au laboratoire que l'activation d'ARF6 atteint son maximum entre 1 et 2 minutes (Béglé et al., 2009). Etant donné que le maximum d'activation de Rac1 intervient après 10 minutes de stimulation, l'hypothèse la plus probable serait un mode d'activation séquentielle des deux GTPases.

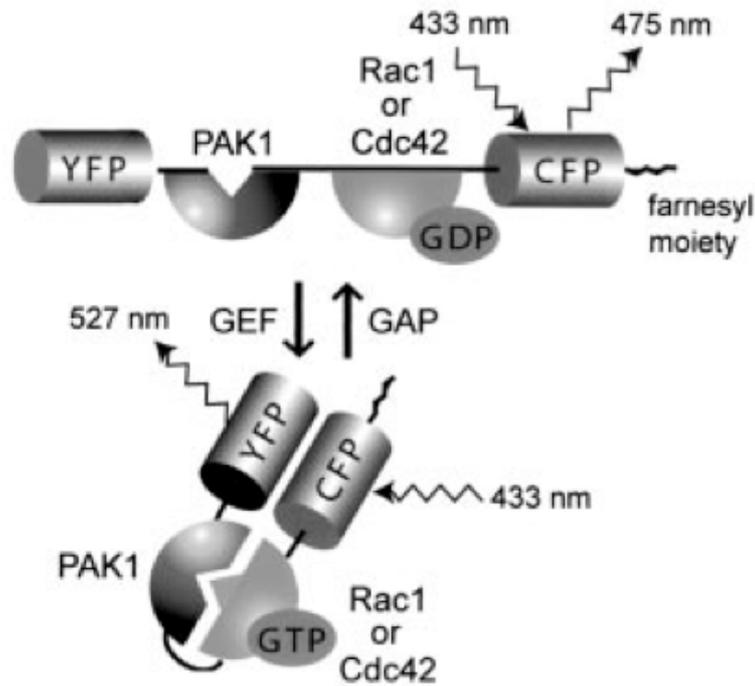


Figure 40: Représentation schématique du fonctionnement d'une sonde Raichu: Cette sonde protéique est constituée d'un fluorophore YFP, du domaine effecteur de PAK1, d'une GTPase (Rac1 ou Cdc42) et du fluorophore CFP. Lorsque Rac1 ou Cdc42 sont liées au GDP, une fluorescence est émise à 475 nm après excitation à 433 nm. Lorsque les GTPases sont actives (sous forme GTP) elles vont se lier au domaine effecteur de PAK1. Le changement de conformation aboutit au rapprochement des deux fluorophores. Après excitation à 433 nm, le CFP, en émettant de la fluorescence, va exciter le YFP qui va émettre une fluorescence à 527 nm. D'après Itoh et al., 2002.

Cependant, la comparaison entre les cinétiques d'activation n'est pas possible à l'heure actuelle car la technique de test d'activation de Rac1 que j'utilise au cours de notre étude (Pull Down, cf. matériels et méthodes) n'est pas assez sensible en terme de résolution temporelle. L'utilisation de sonde Raichu nous permettrait d'appliquer la technique du FRET afin de mesurer de façon plus précise, la cinétique d'activation de Rac1 (**Figure 40**) (Aoki et al., 2004). Ces sondes ont déjà été utilisées avec succès puisqu'elles ont montré une activation cyclique de l'activation de Rac au cours de la croissance neuritique dans les cellules PC12 traitées au NGF (Aoki et al., 2004). L'utilisation de ces sondes serait précieuse dans notre cas car elle permettrait de renseigner sur la cinétique d'activation de Rac1 mais également sur la possibilité d'un mode d'activation cyclique de Rac1.

RSK2 est un autre régulateur qui s'ajoute au schéma, déjà complexe, de la régulation de l'activation de la PLD1. En effet, les récents travaux de Maria Zeniou-Meyer et collaborateurs montrent que la PLD1 ne peut être active que si elle est phosphorylée par la Ribosomale S6 Kinase 2 (RSK2) sur le résidu Thréonine 147, région présentant une sensibilité au calcium (Zeniou-Meyer et al., 2008). Cette protéine est impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la survie cellulaire, le cycle cellulaire ou encore la régulation de la transcription (Frodin and Gammeltoft, 1999). De plus, une mutation de la protéine RSK2 est responsable du syndrome de Coffin-Lowry, une pathologie impliquant un retard mental sévère associé à des anomalies squelettiques et dentaires (Trivier et al., 1996). Des expériences d'immunoprécipitation suggèrent une interaction RSK2-Scrib dans les cellules PC12 (Nicolas Vitale, communication personnelle). Le recrutement de RSK2 à la membrane plasmique pourrait donc se faire par l'intermédiaire de la protéine d'échafaudage Scrib. Une autre question se pose alors : RSK2 pourrait-elle phosphoryler β Pix ? En effet, une étude réalisée sur des cellules PC12 suggère l'importance des phosphorylations de β Pix pour sa translocation au niveau de la membrane plasmique pour la formation des neurites (Shin et al., 2002). Nous pourrions alors imaginer que la stimulation de l'exocytose aboutit à l'activation de RSK2 qui va phosphoryler le facteur d'échange β Pix. Cette phosphorylation permettrait la translocation β Pix qui se lierait ensuite à Scrib au niveau des sites d'exocytose. β Pix, GIT1 et RSK2 pourrait être sous la forme d'un complexe multi-protéiques, participant, directement et indirectement, à la régulation fine de l'activité de la PLD1. Là encore, ces hypothèses ne demandent qu'à être expérimentées.

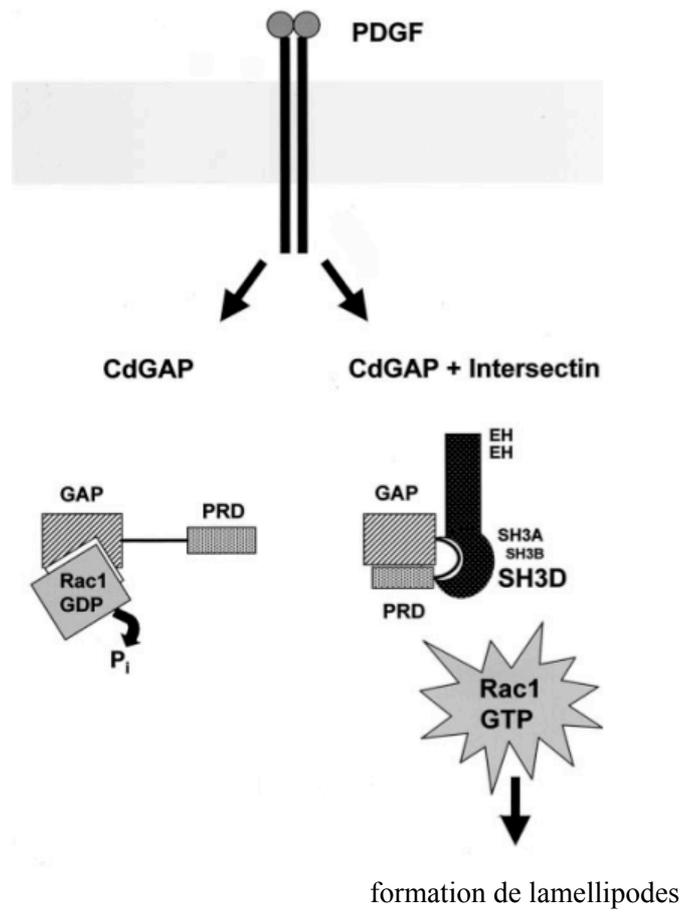


Figure 41: Régulation de l'activité GAP de CdGAP par l'intersectin dans une lignée de fibroblastes. D'après Jenna et al., 2002.

d- Quelle GAP pour Rac1 ?

Au cours de notre étude, nous nous sommes focalisés sur la voie d'activation de Rac1 et nous avons pu identifier β Pix comme facteur d'échange. Ces résultats soulèvent la question du mode d'inactivation de Rac au cours de l'exocytose. Parmi les différentes GAP répertoriées pour les GTPases de la famille Rho, deux d'entre elles ont attiré particulièrement notre attention : CdGAP et l'oligophrenine.

Le groupe de Nathalie Lamarche-Vane a montré dans des fibroblastes que l'activité de CdGAP peut être étroitement régulée par l'intersectine 1-L, le facteur d'échange assurant l'activation de Cdc42 au cours de l'exocytose dans les cellules PC12 (Malacombe et al., 2006b). L'interaction entre CdGAP et l'intersectine semble inhiber l'activité GAP (**Figure 41**) (Jenna et al., 2002). Au vu de ces observations, il est tentant d'imaginer l'existence d'un complexe CdGAP/intersectine au niveau des sites d'exocytose ce qui permettrait une régulation séquentielle de Rac1 et Cdc42. La présence de CdGAP, son interaction avec l'intersectine et son rôle éventuel dans l'inactivation de Rac1 seront testés prochainement au laboratoire. Une analogie intéressante peut être faite aussi avec le complexe GIT1/ β Pix qui est recruté au niveau des sites d'exocytose dans les cellules PC12 par Scribble (Publication 1 ; (Audebert, et al., 2004)

L'oligophrenine-1 pourrait être également un candidat privilégié au rôle de GAP de Rac. Certaines mutations sur le gène Oligophrenine-1, porté par le chromosome-X, sont à l'origine d'un syndrome de retard mental sévère. L'oligophrenine est une protéine neuronale qui possède un domaine GAP capable d'inactiver *in vitro* RhoA, Rac1 et Cdc42 (Billuart et al., 1998). Bien que sa fonction précise soit encore peu connue, l'oligophrenine semble être impliquée dans le trafic des vésicules synaptiques (Malik Khelfaoui communication personnelle) et jouer un rôle dans la plasticité synaptique (Humeau et al., 2009). Cette GAP a également la particularité de posséder un domaine BAR (Bin, Amphiphysin, Rvs) dont la propriété de senseur de courbures de membrane en fait un candidat idéal pour les phénomènes de trafics membranaires (Ren et al., 2006). De plus, ce domaine semble réguler négativement l'activité GAP de l'oligophrenine, suggérant une coordination entre l'état de courbures de membranes et le degré d'activation des protéines Rho (Fauchereau et al., 2003). On pourrait imaginer un mécanisme similaire où le déclenchement de l'exocytose induisant des courbures de membranes pourrait inhiber l'activité GAP de l'oligophrenine. L'endocytose compensatrice ou le retour à un état normal de la membrane pourrait alors activer de nouveau la protéine, aboutissant à une hydrolyse du GTP par Rac1. Cependant, ce scénario est loin d'être vérifié.

Une étude est en cours au laboratoire, en collaboration avec Malik Khelfaoui (Institut Cochin, Paris), afin de déterminer si le processus d'exocytose est perturbé dans des cellules chromaffines issues de souris oligophénine -/-.

III- Conclusions

Au cours de cette première partie de résultat, nous nous sommes attachés à décortiquer la cascade moléculaire faisant intervenir la GTPase Rac1. L'implication de Rac1 au cours de l'exocytose semblait faire l'unanimité, en revanche la nature de son rôle était controversée. Comme c'est souvent le cas avec les GTPases Rho, nous aurions pu nous attendre à une implication dans la régulation du cytosquelette d'actine. A l'inverse, notre étude met clairement en évidence l'importance de Rac1 dans la régulation de la PLD1 au cours de l'exocytose régulée par le calcium dans les cellules PC12.

Ces données mettent en lumière un lien direct entre Rac1 et la fusion membranaire *via* la production de PA au niveau de la membrane plasmique. De par sa petite tête polaire et sa forme de cône, le PA favorise les courbures de membranes entre le granule de sécrétion et la membrane plasmique. Notre étude ajoute un élément de complexité à la régulation multifactorielle de l'activité de la PLD1 au cours de l'exocytose. Les prochains travaux devront tenter d'intégrer l'ensemble des régulateurs de cette enzyme dans un schéma commun.

Au cours de la partie suivante, je vais aborder un autre aspect du processus de sécrétion qui requiert également la régulation contrôlée de la dynamique des phospholipides : l'endocytose compensatrice.

Mécanismes moléculaires de l'endocytose compensatrice: rôle de la scramblase 1

Les lipides de la membrane plasmique sont distribués de façon asymétrique (cf. page 31). De façon intéressante, cette organisation particulière entre les deux feuillets n'est pas figée mais, au contraire, subit une constante réorganisation. En effet, certaines fonctions biologiques telles que la phagocytose, la coagulation sanguine, la polarité cellulaire ou encore le trafic membranaire requièrent le transport d'un ou plusieurs type de lipides d'un feuillet à l'autre de la membrane plasmique. Cet aspect dynamique de la membrane plasmique nous a semblé très intéressant dans le contexte de l'endocytose compensatrice faisant suite à l'exocytose (cf. page 29). Avant de rentrer dans le vif du sujet, je décrirai brièvement les différents transporteurs contrôlant ces mouvements de lipides en me concentrant sur la scramblase et son implication dans les processus d'exo-endocytose.

I- Dynamique transmembranaire des lipides : une question de transporteurs

A- Généralités

Un peu de terminologie pour commencer. Le transport des lipides d'un feuillet à l'autre est communément appelé le « Flip-Flop », le « Flip » désignant la translocation de lipides depuis le feuillet externe vers le feuillet interne/cytoplasmique de la membrane plasmique et le « Flop » désignant le transport inverse. Les mouvements de lipides de part et d'autre de la membrane plasmique peuvent se faire de façon spontanée mais ce processus est parfois extrêmement lent car il dépend principalement de la taille et de la charge de la tête polaire. Différentes protéines transmembranaires, nommées translocases, sont capables de catalyser le transport des lipides au travers de la bicouche. A l'heure actuelle, on dénombre au moins trois classes de translocases que l'on peut désigner sous les termes de flippases, floppases et scramblases (**Figure 42**). Attention, dans la littérature, le terme de flippase est parfois utilisé comme terme générique pour désigner ces 3 types de translocases.

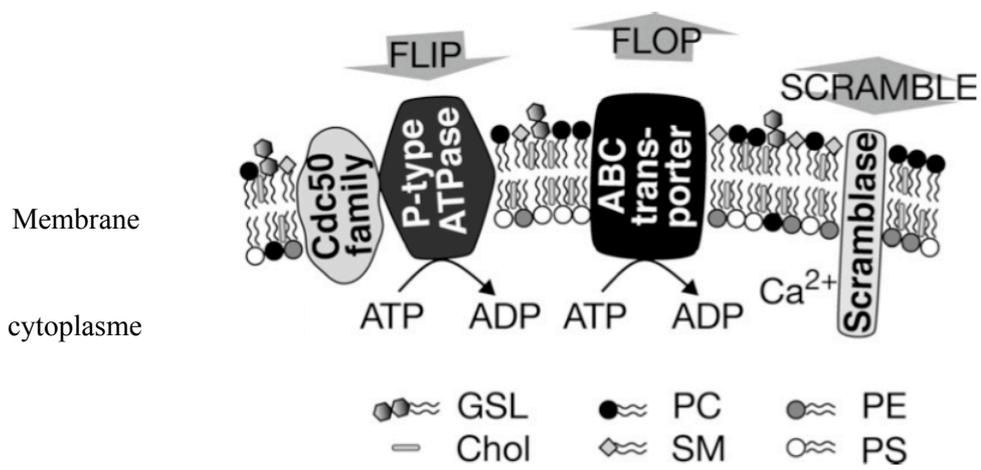


Figure 42: Représentation schématique des trois types d'enzymes permettant la translocation des glycérophospholipides à la membrane plasmique. D'après Ikeda 2006.

Les flippases, aussi appelées amino-phospholipides translocase, sont des ATPases qui vont permettre de transporter spécifiquement le PS ainsi que, dans une moindre mesure, le PE du feuillet externe vers le feuillet interne. Elles sont constituée de différents membres appartenant à la famille des Cdc50 et des P-ATPases (Ikeda et al., 2006). Les floppases sont également dépendant de l'ATP et transportent les glycerophospholipides du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique. Chez les eucaryotes, les floppases sont constitués par les membres de la famille des transporteurs ABC (pour « ATP Binding Cassette »). Chaque isoformes possèdent une spécificité différente dans la nature des phospholipides à transporter (Callaghan et al., 2006). Enfin les scramblases (PLSCR pour phospholipid scramblase), comme leur nom l'indique, rendent aléatoire la distribution des phospholipides en transportant l'ensemble des glycérophospholipides sans spécificité de direction aucune.

B- Les scramblases

A ce jour, quatre scramblases ont été identifiés (scramblase 1 à 4). L'ensemble des scramblases sont des protéines transmembranaires de type II contenant un domaine de liaison au calcium hautement conservé dans la partie C-terminale (Sahu et al., 2007). En effet, l'activité de transport des scramblases est indépendante de l'ATP mais est déclenchée par une augmentation du calcium intracellulaire. A l'exception de l'isoforme 2, seulement exprimé dans les testicules, les trois autres isoformes sont exprimés dans différents tissus (Wiedmer et al., 2000). Au niveau de leur localisation subcellulaire, seule la scramblase 1 est présente à la membrane plasmique tandis que les scramblases 2 et 3 sont localisées respectivement au niveau du noyau et des mitochondries (Ndebele et al., 2008). La scramblase 1 peut être associée au rafts (Sun et al., 2002) ce qui constitue une localisation de choix dans le cadre d'une régulation des mécanismes d'exo-endocytose (cf. page 32). La localisation de la scramblase 4 reste à déterminer.

En plus du domaine liant le calcium, les isoformes 1, 3 et 4 possèdent des domaines PXXP et PPXY (permettant l'interaction avec des protéines à domaines SH3 et WW), un domaine riche en cystéine et un domaine atypique de localisation nucléaire (domaine NLS). Les scramblases 1 et 3 sont les plus étudiées. Ces deux isoformes ont été impliquées dans différents processus biologiques tels que l'apoptose, la régulation de l'expression génique, la thrombose, le maintien de l'homéostasie de la mitochondrie ou le métabolisme des lipides (Sahu et al., 2007).

En dehors du fait qu'il nécessite du calcium et pas d'ATP, le mode d'activation des scramblases n'est pas connu. La palmitoylation permet un adressage aux membranes mais pourrait être importante également pour son activité enzymatique (Sahu et al., 2007). Les scramblases peuvent subir également des phosphorylations sur des résidus tyrosine. Cela a notamment été montré dans des fibroblastes où l'activation du récepteur à l'EGF par son ligand induit une phosphorylation de la scramblase 1 (Nanjundan et al., 2003).

II- Scramblases et transport de phosphatidylsérine dans les mécanismes d'exo-endocytose

A- Etat des lieux

L'exocytose s'accompagne d'une externalisation de PS dans différentes cellules sécrétrices telles que les mastocytes, les neurones, les cellules chromaffines et les PC12 (Kato et al., 2002 ; Lee et al., 2000 ; Malacombe et al., 2006b) (cf. publication 2, figure 4). De façon intéressante, cette translocation semble avoir lieu spécifiquement au niveau des sites d'exocytose (Demo et al., 1999). Cependant, à l'heure actuelle, la fonction exacte de ce transfert de PS n'est pas connue.

Deux transporteurs pourraient catalyser le transport de PS induit au cours de l'exocytose, les floppases de type ABC ou les scramblases. A ce jour, aucun rôle des transporteurs ABC dans les processus d'exocytose n'a été décrit. En revanche, quelques études suggèrent l'implication de la scramblase mais les conclusions divergent. L'inactivation génique des scramblases chez la mouche *Drosophila melanogaster* stimule la neurotransmission en augmentant le recrutement des vésicules synaptiques (Acharya et al., 2006). Dans les mastocytes, la diminution de l'expression de la scramblase 1 bloque la dégranulation (Amir-Moazami et al., 2008) tandis que l'expression d'un mutant ne possédant plus d'activité scramblase n'as pas d'effet (Kato et al., 2002).

Quel lien existe-t-il entre ces effets présumés de la scramblase sur l'exocytose et le transport de PS qu'elle catalyse? Acharya et collaborateurs montrent que l'externalisation de PS est inchangée sur des cellules n'exprimant plus de scramblase. Cependant, le test de mesure de PS à la surface cellulaire a été réalisé en induisant l'apoptose (Acharya et al.,

2006). Dans les mastocytes, l'externalisation de PS induite au cours de la dégranulation semble dépendre du mode de stimulation utilisé (Smrz et al., 2008).

En conclusion, le rôle de la scramblase et du transport de PS au cours de l'exocytose est loin d'être établi.

B- Rôle potentiel au cours de l'endocytose compensatrice dans les cellules chromaffines

1- Bilan des données actuelles

Finally, what do we know exactly about the mechanisms that regulate compensatory endocytosis in neuroendocrine cells? In the 1980s, immunofluorescence experiments showed that granule components can be recaptured after exocytosis (Patzak et al., 1984 ; Patzak and Winkler, 1986 ; Phillips et al., 1983). From a mechanistic point of view, data obtained by membrane capacitance measurements suggest the involvement of clathrin and dynamin (cf. page 29). However, what about the spatial coupling of exocytosis with endocytosis? At the beginning of the 2000s, the advent of evanescent wave microscopy (TIRFM) allowed visualizing the behavior of secretion granules at the plasma membrane, before and after exocytosis. Numerous studies propose a mechanism where the granule does not collapse into the plasma membrane, preserves its shape and is recaptured intact (Perrais et al., 2004 ; Taraska et al., 2003). It is well known, in this case, that the phenomenon is Kiss and Run and/or cavicapture (Tsuboi and Rutter, 2003). On the other hand, the mode of endocytosis after granule collapse at the plasma membrane (exocytosis of type full fusion ; voir page 21) is very little known and one can wonder in which measurement and how the membrane of secretion granules, transiently inserted into the plasma membrane during a type « full fusion/full collapse », is recaptured.

The aim of our study, presented here, is to highlight the mechanisms that regulate compensatory endocytosis in chromaffin cells, preferentially of the « full fusion » type. When we approach this subject, two main questions arise inevitably : how does the secretion granule preserve its integrity within the plasma membrane during exocytosis and what is the signal that triggers endocytosis? It is by asking these questions that we decided to orient our work towards scramblase and PS transport. In fact, by reorganizing the

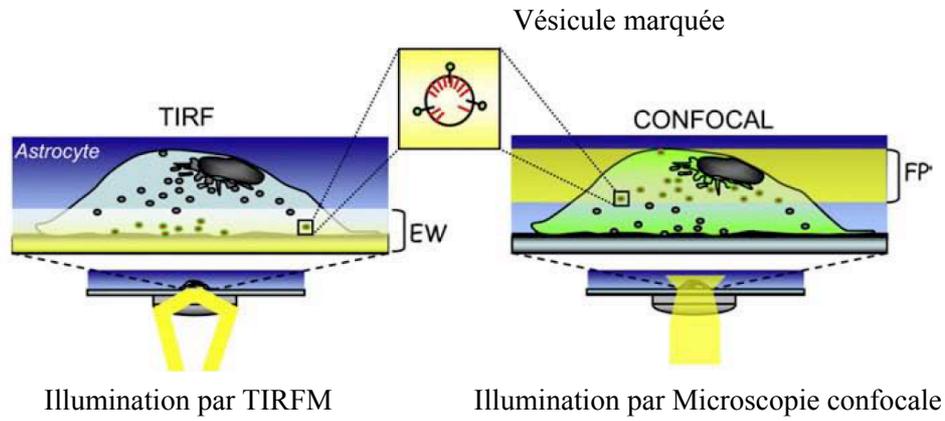
distribution des phospholipides au niveau du site d'exocytose, il est tentant d'imaginer que la scramblase puisse participer au maintien de l'intégrité du granule de sécrétion en attendant sa recapture. De plus, le PS étant un phospholipide de signalisation important, capable d'interagir avec un grand nombre de protéines, on peut également imaginer qu'une translocation du PS vers le feuillet membranaire externe puisse constituer un signal d'endocytose en favorisant, par exemple, le recrutement de molécules de la machinerie d'endocytose.

Afin d'apporter des éléments de réponse à ses hypothèses, nous avons cherché à savoir 1) si la membrane des granules de sécrétion gardait son intégrité après collapse dans la membrane plasmique, 2) si l'activité de la scramblase était impliquée dans la recapture des granules de sécrétion et 3) par quels mécanismes cette capture avait lieu (clathrine et/ou dynamines). La majorité des résultats obtenus sont regroupés sous forme d'un manuscrit préliminaire que nous allons soumettre pour publication. J'ai également souhaité vous présenter nos données récentes sur l'intervention de la dynamine (voir résultats complémentaires page 72). Ma participation à ce projet s'est effectuée à plusieurs niveaux. J'ai réalisé l'ensemble de l'étude sur la dynamine et j'ai étudié l'effet des mutants scramblase sur la recapture des granules. Enfin j'ai consacré un temps important à essayer de mettre en évidence la présence et la localisation de la scramblase endogène dans les cellules PC12 et chromaffines. Je ne détaillerai pas ces données puisque jusqu'à présent, mes tentatives se sont avérées infructueuses. Lorsque Mara Ceridono a démarré ce projet, il fallait décider d'une technique qui nous permettrait de visualiser spécifiquement la recapture, après exocytose, des composés granulaires. Avant de vous présenter nos résultats, j'aimerais présenter l'intérêt du test que Mara Cériidono et Stéphane Ory ont mis au point.

2- Intérêt de la mise au point d'un test d'internalisation

Les données concernant l'endocytose compensatrice dans les chromaffines proviennent de résultats obtenus par capacitance membranaire dans le groupe de C. Artalejo. Cette technique électrophysiologique permet une grande résolution cinétique mais n'apporte pas d'informations visuelles. Ainsi il est difficile de discriminer les changements de capacitance dus spécifiquement au trafic des granules de sécrétion de tout autre processus aboutissant à un apport ou un retrait de membrane (Chen et al., 2001). De plus, les expériences sont réalisées dans une configuration « cellule entière » pour laquelle la solution présente dans la pipette est en continuité avec le milieu intracellulaire (**Figure 19**). Ce mode d'expérimentation permet de contrôler le contenu du milieu intracellulaire de la cellule et

A



B

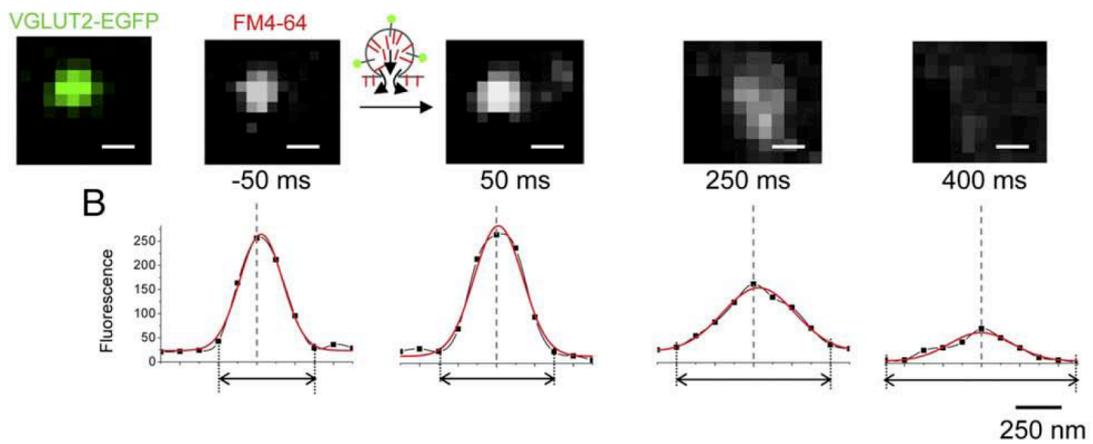


Figure 43: Principe de la microscopie TIRF. D'après Cali 2008.

notamment la concentration en calcium. En appliquant cette méthodologie, les auteurs ont étudié l'importance des différentes protéines en ajoutant dans la pipette de patch des anticorps et des domaines peptidiques empêchant ainsi l'activité ou l'interaction entre les protéines. Or l'utilisation d'anticorps ou de domaine SH3 peut s'avérer aspécifique et aboutir à des encombrements stériques en empêchant le recrutement d'autres partenaires (Kaneko et al., 2008).

Une autre approche généralement utilisée est la microscopie à onde évanescente ou microscopie TIRF (« Total Internal Reflection Fluorescent Microscopy ») (**Figure 43**). Cette technique de microscopie qui possède une très bonne résolution spatiale et temporelle et qui permet d'observer des événements ayant lieu à proximité de la membrane plasmique. Cette approche est basée sur la propriété physique de la réflexion totale. Au lieu d'illuminer perpendiculairement l'objet d'étude, le système TIRFM illumine l'objet avec un certain angle d'incidence dit « critique » (en fonction des indices de réfraction des différents milieux) qui provoque une réflexion totale de la lumière. Une propagation d'énergie parallèle à la zone de contact entre la lumière et la surface illuminée va se créer. Cette « onde évanescente » va exciter les particules présentes à proximité de la zone de contact. La profondeur de l'onde évanescente qui dépend de l'angle d'incidence de la lumière et des longueurs d'ondes d'excitation, se situe entre 100 et 300 nm de la zone de contact (Axelrod et al., 1983 ; Toomre and Manstein, 2001). Ce type de microscopie permet de suivre avec une bonne résolution temporelle (ms) l'exocytose de vésicules uniques. Cependant, le champ évanescent étant restreint, on perd rapidement l'information sur le devenir des composés du granule une fois l'endocytose achevée.

Au laboratoire, Mara Ceridono et Stéphane Ory ont mis au point un test permettant de visualiser l'internalisation et le devenir des composants de la membrane des granules. Ce test est basé sur l'internalisation d'un anticorps dirigé contre une protéine, la dopamine β hydroxylase (DBH) dont le principe est illustré **Figure 44**.

A ce stade de développement, ce test n'apporte pas d'information en terme de cinétique d'exo-endocytose puisque l'internalisation d'anticorps anti DBH est analysée par microscopie confocale sur cellules fixées. Le taux d'internalisation de la dopamine β hydroxylase est évalué en calculant la position du marquage DBH par rapport à la membrane plasmique via la technique des cartes de distances Euclidienne. Cette méthode de quantification a été mise au point au laboratoire pas Stéphane Ory. Il est important de garder

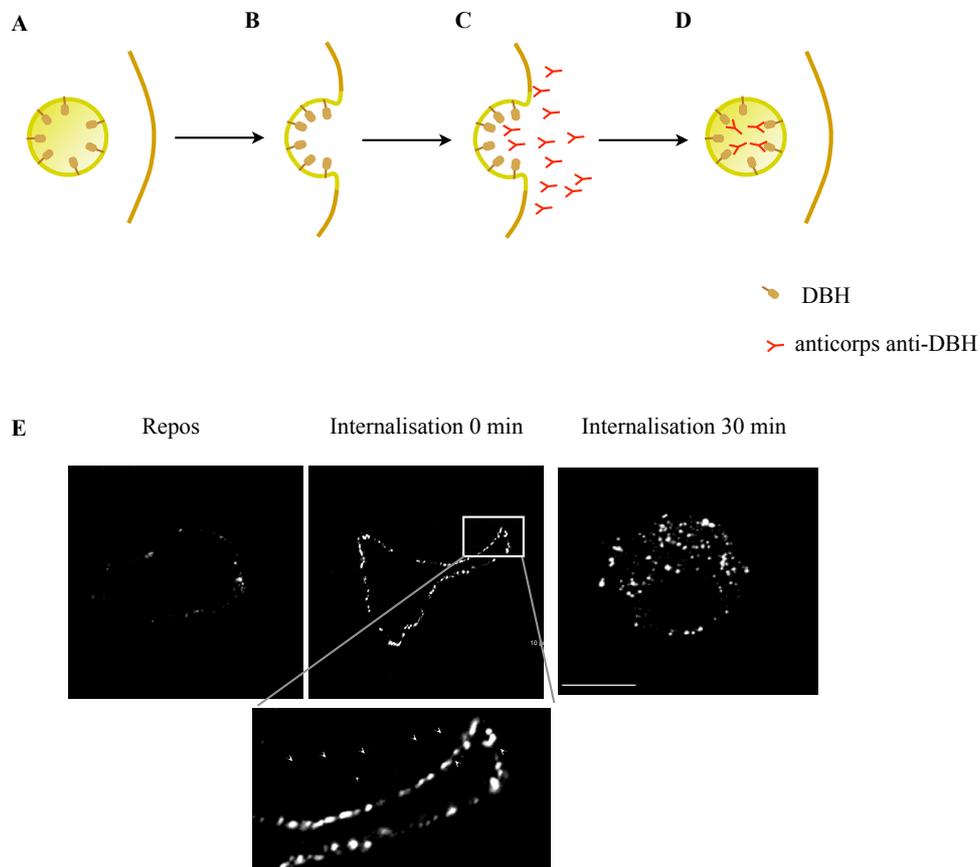


Figure 44: Principe du test d'internalisation de la DBH. Lorsque le granule fusionne avec la membrane plasmique (B), la partie cytosolique de la DBH est exposé sur la face externe de la membrane plasmique. Les cellules sont ensuite incubées à 4°C avec un anticorps anti-DBH (C). En incubant à nouveau les cellules à 37 °C, il est possible de suivre l'endocytose, les vésicules ayant internalisé la DBH marquée par l'anticorps (D). E- Acquisition d'image de cellules chromaffines par microscopie concociale après un test d'internalisation de la DBH sur des cellules au repos, stimulées sans internalisation ou après 30 minutes d'internalisation.

en tête que ce test de suivie de l'endocytose compensatrice ne permet seulement de visualiser des évènements d'endocytose ayant lieu après la création d'un pore de fusion suffisamment important pour que l'anticorps anti-DBH puisse accéder à sa cible. Autrement dit, l'endocytose de granule ayant exocyté après un événement de « Kiss and Run » n'est pas observable par cette technique. En collaboration avec l'équipe de Yannick Bailly, ce test a été adapté en microscopie électronique afin d'obtenir des informations ultra-structurelles quand au mode d'internalisation de la DBH.

III- Publication 2 : « Calcium-dependent scramblase is required for secretory granule recycling in neuroendocrine cells »

Mara Ceridono, Fanny Momboisse, Stéphane Ory, Valérie Calco, Anne-Marie

Haeberlé, Yannick Bailly, Marie-France Bader & Stéphane Gasman

**Calcium-dependent scramblase is required for secretory granule recycling
in neuroendocrine cells**

Mara Ceridono, Fanny Momboisse, Stéphane Ory, Valérie Calco, Anne-Marie
Haeberlé, Yannick Bailly, Marie-France Bader & Stéphane Gasman

*Département Neurotransmission & Sécrétion Neuroendocrine, Institut des Neurosciences
Cellulaires et Intégratives (UMR 7168), Centre National de la Recherche Scientifique &
Université Louis Pasteur, 5 rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France*

==--==--

***Corresponding author:** Stéphane Gasman, address as above. Tel.: 33 388 45 67 12

Fax: 33 388 60 16 64; e-mail: gasman@neurochem.u-strasbg.fr

Running title: Scramblase and secretory granule recycling

Word count: 56 793

Abstract

Secretion of hormones and neuropeptides by neuroendocrine cells occurs through exocytosis. After fusion of granules with the plasma membrane, secretory cells must necessarily retrieve an excess of cell surface membrane. Yet, most of our current knowledge is related to exocytosis, and much less is known concerning the molecular basis for compensatory endocytosis. Using cultured chromaffin cells, we show here that nicotine or high K^+ stimulation triggers granule fusion and full collapse with the plasma membrane. Fusion is accompanied by the activation of a scramblase resulting in the translocation of phosphatidylserine (PS) from the cytoplasmic lipid leaflet to the luminal leaflet of the granule membrane transiently exposed at the cell surface. Following internalization of anti-dopamine- β -hydroxylase antibodies, we found that expression of a calcium-insensitive scramblase 1 mutant that inhibits outward translocation of PS does not affect secretion but inhibits the recapture of the granule membrane by impairing with clathrin recruitment. Our results support the idea that scramblase-mediated lipid reorganization represents part of the machinery that mediates specific recapture of the granule membrane in secreting neuroendocrine cells.

Introduction

Calcium-regulated exocytosis in neurons and neuroendocrine cells involves a common scenario based on the recruitment, docking and fusion of secretory vesicles/granules with the plasma membrane, and this leads to the release of intra-vesicular products into the extracellular space. To maintain a constant cell surface area and to allow secretory vesicle recycling, exocytosis must be followed by compensatory membrane uptake. In neurons, two main models for compensatory endocytosis and synaptic vesicle recycling have been proposed and intensively debated (Rizzoli and Jahn, 2007). Full fusion (also referred to as full collapse) of vesicles with the plasma membrane completely empties the vesicle's contents, and subsequent membrane recycling occurs directly from the active zone or at a distal location. Alternatively, "kiss-and-run" posits that vesicles "kiss" the membrane releasing their contents through a transient fusion pore and then "run" away by being retrieved *per se* following closure of the fusion pore.

In neuroendocrine cells, depending the mode of stimulation and the cytosolic calcium concentration elicited, catecholamine secretion can occur through kiss-and-run, where catecholamines are released through a narrow fusion pore while larger neuropeptides are retained in the granule core (Fulop et al., 2005; Fulop and Smith, 2006; Gong et al., 2007), cavicapture (granule cavity capture) in which the fusion pore dilation allows the partial release of neuropeptides while the fusing granule omega shape is preserved (Henkel and Almers, 1996; Llobet et al., 2008; Perrais et al., 2004; Taraska et al., 2003) or full collapse where granules loose their round shape by flattening out in the plane of the plasma membrane and completely empty their contents (Elhamdani et al., 2006; Fulop et al., 2005; Fulop and Smith, 2006). Yet, there are major mechanistic differences between these three modes of secretion and one can predict that the respective compensatory endocytotic processes may not be unique. Evidence that secretory granules can be retrieved intact after kiss-and-run or cavicapture has been obtained by cell capacitance measurements (Artalejo et al., 1995; Smith and Neher, 1997), TIRF microscopy (Perrais et al., 2004; Taraska et al., 2003) and recently by interference reflection microscopy (Llobet et al., 2008). Morphological analyses performed in the 80's suggest that the granule membrane transiently incorporated into the plasma membrane may be selectively recaptured (Patzak et al., 1984; Patzak and Winkler, 1986). However, to what extent the granular components are maintained together during and after

exocytosis, the type of signals triggering the subsequent granule recapture and the characteristics of the underlying molecular machinery remain key unsolved questions.

The dynamics of membrane lipids is crucial for a wide variety of cellular functions. Indeed, modifications of the lipid composition and organization of the lipid membrane as specific domains regulate many aspects of membrane trafficking processes. One fascinating feature of the plasma membrane is the asymmetric distribution of phospholipids between the inner and the outer leaflets. Phosphatidylserine (PS) and phosphatidylethanolamine (PE) reside in the inner cytoplasmic leaflet while phosphatidylcholine and sphingomyelin are located in the outer leaflet (van Meer et al., 2008). In non-apoptotic cells, several biological functions require the disruption of this phospholipid asymmetry resulting in externalization of PS and PE on the outer leaflet of the plasma membrane (Ikeda et al., 2006). Interestingly, outward translocation of PS at the cell surface has been shown to be intimately linked to exocytotic activity in various secretory cell types (Demo et al., 1999; Devaux, 2000; Kato et al., 2002; Lee et al., 2000; Malacombe et al., 2006). This externalization of PS seems to be triggered by a calcium-sensitive phospholipid scramblase protein, a membrane-bound lipid transporter that randomizes the phospholipid distribution across the membrane in a Ca^{2+} -dependent manner and thereby collapses phospholipid asymmetry (Basse et al., 1996; Devaux et al., 2006). To date, the functional importance of lipid scrambling for secretion and/or the efficiency of the exocytotic machinery remains controversial (Acharya et al., 2006; Kato et al., 2002; Smrz et al., 2008). However, by forming a lipid platform that retains granular membrane components waiting to be retrieved or by acting as a signal for the recruitment of endocytotic components, PS and its carrier protein scramblase are ideal candidates for regulating post-exocytotic events and the early stages of compensatory endocytosis in neuroendocrine cells.

The aim of the present work was to investigate the molecular mechanisms governing compensatory endocytosis of the secretory granule membrane during neuroendocrine secretion. Using chromaffin cells, we show here that full collapse of the granule membrane within the plasma membrane is accompanied by a scramblase-mediated outward transport of PS at the exocytotic sites. Moreover, we demonstrate that outward translocation of PS is the signal that enables selective recapture the secretory granule membrane through a clathrin-mediated endocytosis process. This is the first evidence for a role of membrane lipid organization and calcium-dependent scramblase activity in the endocytotic phase of regulated neuroendocrine secretion.

Results

Secretory granule membrane is selectively internalized after exocytosis and full collapse with the plasma membrane

In stimulated chromaffin cells, granule fusion with the plasma membrane and subsequent fusion pore dilatation trigger transient accessibility of intra-luminal membrane-associated granule proteins, like dopamine- β -hydroxylase (DBH), to the extracellular space (Figure 1A). Therefore, exocytotic spots on the chromaffin cell surface can be visualized by incubating living cells with anti-DBH antibodies (Gasman et al., 1997; Malacombe et al., 2006; Wick et al., 1997). We took advantage of this technique to follow the internalization of the secretory granule membrane. Following stimulation with 10 μ M nicotine, exocytotic activity and secretion was accompanied with the appearance of discrete patches of DBH at the plasma membrane. Chasing for different periods of time the fate of the anti-DBH antibodies bound to the cell surface revealed that the DBH patches were at the cell surface for 1 to 2 min, and then became restricted to the cell interior after 5 min (Figure 1B), indicating that the granule marker was efficiently internalized following exocytosis. Longer periods of chase (> 20 min) led to the progressive accumulation of the DBH spots in the perinuclear region (Figure 1B). Plasma membrane and internalized DBH patches were also labeled with PHluorin-tagged phogrin and with antibodies against the vesicular mono-amine transporter 2 (not shown), two known trans-membrane markers of secretory granules (Sagne et al., 1997; Taraska et al., 2003), consistent with the assumption that DBH internalization represented specific compensatory endocytosis of the exocytosed secretory granule membrane.

To determine the kinetics of internalization, we measured the distance separating DBH-positive spots from the cell edge using Euclidean distance map (EDM; for details see supplementary Figure S1). EDM values corresponding to a plasma membrane localization were determined by analyzing two plasma membrane bound proteins: SNAP25 (not shown) and the ATP-receptor CD39 (supplementary Figure S1). Immunofluorescent analysis of the distribution of these two proteins indicated that a large majority of the labelling (~ 90%) was found localized at a distance corresponding to EDM values ranging between 1 and 20. As a consequence, DBH dots with an EDM value < 20 were considered to be present on the plasma membrane, whereas DBH dots with EDM values > 20 were considered to be cytoplasmic and internalized. In stimulated cells, 95 ± 1.1 % of DBH-containing spots were found on the

plasma membrane (Figure 1C). This situation remained more or less unchanged for the first 1 or 2 min, and then internalization started, to reach a plateau at 20 min where $85 \pm 1.7\%$ of the DBH spots were found in the cytoplasm. This time course of internalization was confirmed using an endocytosis assay based on cell surface biotinylation. DBH underwent a time-dependent uptake that fitted in a single exponential with a time constant (τ) of 5.5 min. In good correlation with the values obtained by EDM analysis, about 80% of DBH was internalized after 20 min (supplementary Figure S2).

We monitored exocytosis and subsequent DBH internalization at the ultrastructural level by immuno-electron microscopy. In agreement with the light microscopic observations (Figure 1B), gold particles corresponding to DBH antibodies were rarely observed in resting chromaffin cells (Figure 2A). However, after stimulation with nicotine, exocytosis triggered the appearance of gold-labeled DBH clusters on the cell surface. Note that under these conditions of stimulation, granules completely lost their round shape and flattened out in the plane of the plasma membrane (Figure 2B). After 1 min of chase at 37°C, DBH gold labeling became associated with invaginating membranes (Figure 2C and D) and at 5 min, a large proportion of the gold particles were already in intracellular membrane-bound compartments (Figure 2E), confirming that internalization of DBH involves membrane trafficking events.

Since ultrastructural images revealed that the granule membrane flattened out into the plasma membrane following exocytotic fusion, we thought that components of the two membranes might intermingle before endocytosis. Thus, anti-DBH antibody internalization experiments were performed in chromaffin cells expressing a glycosylphosphatidylinositol-anchored GFP (GPI-GFP). As shown in Figure 3, GPI-GFP predominantly labeled the plasma membrane in both resting and stimulated cells. Nicotine stimulation triggered the appearance of DBH positive patches on the cell surface, but it was clear that a large proportion of these exocytotic hot spots did not contain the GPI-GFP signal. Further internalization experiments confirmed that the two compartments do not intermingle, as GPI-GFP did not co-localize with internalized DBH-positive spots after a 15 min chase (Figure 3). In other words, even after full collapse into the plasma membrane, granule membranes remained as physically separated entities prior to compensatory endocytosis.

Phospholipid scramblase triggers the translocation of phosphatidylserine (PS) in the granule membrane fused with the plasma membrane

Several studies have reported the translocation of PS to the external lipid leaflet at the site of exocytotic fusion (Demo et al., 1999; Malacombe et al., 2006; Vitale et al., 2001). To

examine whether translocation of PS occurred at the granule fusion site in chromaffin cells, we performed double staining experiments using externally added anti-DBH antibodies to visualize the fused granule membrane and Alexa568-labeled annexin A5 to specifically detect PS. As illustrated in Figure 4A, a large majority ($71 \pm 3\%$; $n=20$ cells) of the DBH cell surface patches in stimulated cells were also labeled with annexin A5, confirming the translocation of PS to the external lipid leaflet during exocytotic fusion of the granule membrane with the plasma membrane.

Phospholipid asymmetry at the plasma membrane can be abolished by scramblases (Devaux et al., 2006; Sims and Wiedmer, 2001). We decided to explore the possible relationship between the transport of PS observed at the exocytotic sites and a Ca^{2+} -dependent scramblase activity. Chromaffin cells were transfected with cDNAs encoding either wild type phospholipid-scramblase 1 (PLSCR1 WT-EGFP) or a calcium-insensitive scramblase 1 mutant (PLSCR1_{D284A}-EGFP) unable to trigger PS redistribution (Zhou et al., 1998). Both PLSCR1 and PLSCR1_{D284A} mutant were found in the cell periphery and as dots in the cytoplasm suggesting a possible association with some intracellular membrane-bound compartments (Figure 4B). Stimulation of cells expressing wild type PLSCR1 triggered the binding of annexin A5 at the cell surface as efficiently as in non-transfected cells (Figure 4B and C). In contrast, expression of the Ca^{2+} -insensitive PLSCR1_{D284A} mutant drastically inhibited annexin A5 binding (Figure 4B and C). Thus, calcium-dependent PLSCR1 activity is required for PS translocation to the external lipid leaflet at the sites of exocytosis in secretagogue-stimulated cells.

Ca^{2+} -dependent phospholipid scramblase 1 is not involved in exocytosis but is required for secretory granule membrane endocytosis

We next investigated whether the scramblase-induced translocation of PS plays a role in secretory granule exocytosis and/or endocytosis, using the anti-DBH antibody internalization assay. We found that the amount of cell surface DBH patches that appeared upon stimulation was not affected in chromaffin cells expressing PLSCR1 or PLSCR1_{D284A} mutant, suggesting that scramblase 1 does not play a role in exocytosis (Figure 5A, D). This result was confirmed by measuring exocytotic release of growth hormone (GH) from PC12 cells. Neither PLSCR1 nor PLSCR1_{D284A} mutant affected the amount of GH secreted in response to 59 mM K^+ (Figure 5B). In other words, Ca^{2+} -dependent phospholipid scramblase activity is not required for exocytosis in these neuroendocrine cells.

We then investigated the possible implication of PLSCR1 in compensatory endocytosis of the granule membrane after exocytosis. After a 30 min chase, cell surface DBH was efficiently internalized in chromaffin cells overexpressing PLSCR1, but not in cells expressing the PLSCR1_{D284A} mutant (Figure 5C). A quantitative analysis (Figure 5D) revealed that only 37 % ± 2.9 % of the cell surface DBH was internalized in chromaffin cells expressing PLSCR1_{D284A} compared to 78 % ± 8.6 % and 67 % ± 2.9% in nontransfected cells and cells expressing PLSCR1, respectively. These observations suggest that the scramblase-induced re-organization of lipids in the granule membrane after exocytosis is an important event for subsequent membrane retrieval and compensatory endocytosis.

Ca²⁺-dependent phospholipid scramblase 1 is required for clathrin recruitment to exocytosed granule membranes

Clathrin is efficiently recruited to the DBH-containing patches present at the cell surface in stimulated cells (data not shown). Thus, we thought that the translocation of PS that is apparently required for granule membrane internalization might be to some extent linked to the recruitment of clathrin to the exocytosed granule membrane. To probe this idea, we first verified that granule membrane recapture is actually a clathrin-mediated process. Two strategies were employed. The first was based on a RNA interference approach using a plasmid that expresses both EGFP and a siRNA targeted against the clathrin heavy chain and the second relied on the expression of an EH-deleted dominant negative mutant of Eps15 (Eps15_{EΔ95/295}) known to inhibit clathrin-coated pit assembly and specifically block clathrin-mediated endocytosis (Benmerah et al., 1999). Immunofluorescence analysis indicated that cells expressing the clathrin siRNA exhibited a drastic reduction (~90%) in the level of endogenous clathrin (supplementary Figure S3) and transferrin uptake experiments confirmed that both clathrin siRNA and the Eps15_{EΔ95/295} mutant efficiently inhibited clathrin-mediated endocytosis in chromaffin cells (supplementary Figure S4). Figure 6 illustrates the effect of reducing endogenous clathrin or expressing the Eps15_{EΔ95/295} mutant on exocytosis and compensatory endocytosis in chromaffin cells. Neither clathrin siRNA nor Eps15_{EΔ95/295} interfered with the appearance of cell surface DBH patches in stimulated cells (Figure 6A); however, they significantly reduced the quantity of internalized DBH (Figure 6B). This was evidenced by EDM analysis, which indicated that knockdown of clathrin or expression of Eps15_{EΔ95/295} inhibited retrieval of DBH patches by 69 and 66 %, respectively (Figure 5C,

D). Thus, clathrin plays an essential role in the pathway mediating compensatory endocytosis of the secretory granule membrane.

We then expressed PLSCR1 or PLSCR1_{D284A} and examined the distribution of clathrin in resting or stimulated chromaffin cells. Expression of PLSCR1 did not affect the recruitment of clathrin to the sites of exocytosis in cells stimulated with high K⁺ (Figure 6E). Quantification indicated that about 43 ± 2.6% and 40.6 ± 2.4% of the clathrin signal co-localized with DBH in K⁺-stimulated non-transfected and PLSCR1-expressing cells, respectively (Figure 6F). However, expression of PLSCR1_{D284A} decreased more than twice the proportion of clathrin overlapping with DBH (Figure 6E and F). In other words, expression of an inactive scramblase 1 mutant affects the recruitment of clathrin to the granule membrane incorporated into the plasma membrane.

These results suggest that in cells undergoing exocytosis, Ca²⁺-dependent scramblase triggers lipid reorganization and translocation of PS in the granule membrane during fusion with the plasma membrane. This seems to be a prerequisite for efficient recruitment of clathrin and subsequent retrieval of the granule membrane for compensatory endocytosis (Figure 7).

Discussion

Several recent studies support the idea that chromaffin cells release their hormones and peptides through different modes of exocytosis that may shift depending on the physiological demand. Hence, under basal sympathetic tones, cells release mainly catecholamines while under acute stress conditions neuropeptides and large chromogranins are also secreted. Using cultured chromaffin or PC12 cells, it has been observed that short electrical train (0.5 Hz) or rapid local application of depolarizing potassium concentrations trigger kiss and run and/or cavicapture whereas elevated electrical stimulation (15 Hz) promote essentially full fusion events (Fulop and Smith, 2006; Llobet et al., 2008; Perrais et al., 2004; Taraska et al., 2003). The switch from kiss and run to cavicapture and full fusion seems to be linked to the dilatation of the fusion pore, a process that has been shown to be regulated by calcium and multiple factors including protein kinase C, amphiphysin and the actin cytoskeleton (Doreian et al., 2008; Fulop and Smith, 2006; Llobet et al., 2008). Regarding compensatory granule endocytosis, some mechanisms have been proposed. For instance, under low stimulation, retrieval of the granule cavity has been shown to occur independently of clathrin but with the participation of dynamin (Artalejo et al., 2002; Graham et al., 2002; Holroyd et al., 2002). On the other hand, the fate of the granule membrane after full collapse into the plasma membrane remains poorly documented.

In an attempt to study the behavior of the secretory granule membrane after exocytosis, we exposed here chromaffin cells for several minutes to chemical secretagogues (59 mM K⁺, 10 μM nicotine). These conditions trigger long lasting cytosolic calcium rises that have been proposed to reflect acute stress conditions (de Diego et al., 2008; Fulop and Smith, 2007). Using a strategy based on the accessibility of an antibody to the luminal granule-associated DBH, we limited our observations to exocytotic events displaying large fusion pores. We found that under these conditions secretion occurred through fusion and full collapse of secretory granules with the plasma membrane. However, even though, DBH remained clustered at the cell surface to be subsequently internalized through vesicular structures that did not incorporate plasma membrane markers. This observation accounted for DBH but also for some other trans-membrane granule proteins like VMAT2 or phogrin while other granule-associated components like synaptobrevin have been reported to disperse into the plasma membrane after fusion (Allersma et al., 2004; Sankaranarayanan and Ryan, 2000; Tsuboi and Rutter, 2003). In line with our results, lateral diffusion of phogrin was also not been observed in PC12 or pancreatic β cells undergoing exocytosis (Ohara-Imaizumi et al.,

2002; Taraska et al., 2003; Tsuboi and Rutter, 2003). Moreover, earlier morphological analyses suggested that the granule membrane transiently incorporated into the plasma membrane could be selectively recaptured (Patzak et al., 1984; Patzak and Winkler, 1986) and biochemical studies indicated that purified adrenal medulla coated vesicles were mainly composed of granular proteins (Geisow et al., 1985). All together, these findings tend to indicate that, even after full fusion and full collapse with the plasma membrane, the secretory granule membrane remains as a separate entity. In other words, secretory cells seem to be capable of selective sorting at the plasma membrane to keep together some of the granular components in order to specifically retrieve the secretory granule membrane after exocytosis.

How do secretory cells preserve granule membrane plate-form after full collapse into the plasma membrane and precisely sort granule membrane-associated proteins? The present findings suggest that loss of phospholipid asymmetry in the membrane granule might be a possibility. PS is concentrated in the inner leaflet of the plasma membrane, as well as in the outer (cytoplasmic) leaflet of intracellular organelles including secretory granules (van Meer et al., 2008 ; Zachowski et al., 1989). Although loss of asymmetric lipid distribution resulting in the externalization of PS has been associated with secretion in mast cells (Demo et al., 1999), PC12 cells (Malacombe et al., 2006), nerve terminals (Lee et al., 2000) and chromaffin cells (the present study), its functional importance for exocytosis remains controversial (Acharya et al., 2006; Kato et al., 2002). Nonetheless, this report is the first demonstrating a role for scramblase 1 and lipid asymmetry in recycling processes for secretory granules. Translocation of PS occurs specifically at the sites where secretory granule membrane is inserted into the plasma membrane and it is due to the activation of a Ca^{2+} -dependent phospholipid scramblase 1. Moreover, inhibition of PS translocation by expression of a calcium-insensitive scramblase 1 mutant inhibits compensatory endocytosis of the granule membrane without affecting the exocytotic process. Local variations in lipid composition are known to create microdomains that may provide spatial clues to cluster and maintain specific components together within a given membrane. For example, formation of lipid raft microdomains is necessary for the structural and spatial organization of the exocytotic machinery, including SNARE complex assembly (Chasserot-Golaz et al., 2005; Puri and Roche, 2006; Salaun et al., 2005). Interestingly, it has been reported in red blood cells, that loss of phospholipid asymmetry can modify membrane mechanical stability and thus create stable domains (Manno et al., 2002). Therefore, one possible scenario is that local disruption of the membrane phospholipid asymmetry at the exocytotic sites by PS scrambling might be a

signal to help conserve the integrity of the granule membrane following exocytosis in neuroendocrine cells.

Alternatively, PS translocation may also act as a signal for the recruitment of the protein machinery required for subsequent endocytosis. So far, the role of clathrin in secretory granule endocytosis has been only suggested by capacitance measurements performed in highly-stimulated chromaffin cells injected with an inhibitory peptide or with anti-clathrin antibodies (Artalejo et al., 2002; Chan and Smith, 2003). Yet, capacitance does not offer the possibility to selectively follow the fate of the granule membrane. Here, by combining a siRNA approach against clathrin heavy chain with the imaging of DBH internalization, we demonstrate for the first time that secretory granule membrane recapture after full fusion exocytosis is a clathrin-dependent process. Moreover, we observed a functional relationship between scramblase-mediated translocation of PS and clathrin recruitment at the site of granule fusion. This suggests that the scramblase 1-mediated lipid re-organization is linked to the clathrin-mediated endocytotic machinery required for granule membrane retrieval. Yet, internalized DBH was found associated with vesicles ranging from 70 to 100 nm as seen in our ultra-structural images, which is in agreement with energetic constraints required for clathrin basket assembly *in vitro* (Nossal, 2001). In this context, it is worthwhile to recall the findings concerning synaptotagmin, a bifunctional granule-associated transmembrane protein that regulates both exo- and endocytosis. Synaptotagmin binds to negatively charged PS through its C2A and C2B domains (Arac et al., 2006; Shahin et al., 2008), and this interaction has been described as essential for exocytosis (Mackler and Reist, 2001). Interestingly, the cytoplasmic C2AB region of synaptotagmin interacts also directly with some components of the endocytotic machinery, like stonin 2 for instance (Diril et al., 2006). Therefore, it is tempting to imagine synaptotagmin as a PS-dependent molecular switch coupling exocytosis to endocytosis, with PS and endocytotic proteins competing for binding to the same C2AB region. In other words, removal of PS from the cytosolic surface of the exocytosed granule membrane through scramblase 1 activity could be a signal to switch from exocytosis to endocytosis. In addition, since membrane granule integrity is physically preserved, such a mechanism would provide efficient recycling machinery that sorts a granule membrane patch through only one or few copies of synaptotagmin instead of individually sorting the different vesicular proteins that have diffused away.

Finally, how and when PS is transported back to the cytoplasmic leaflet of the endocytosed vesicles remain open questions. One obvious candidate to fulfill this function is ATP81A, an inward lipid translocase (flippase) from the P-type ATPase that controls the

translocation of PS from the luminal leaflet to the cytoplasmic leaflet of secretory granule membrane in chromaffin cells (Zachowski et al., 1989). Since flippase activity is blocked by calcium, a decrease in cytosolic calcium after exocytosis could trigger the reactivation of this granule-associated translocase activity and the subsequent inward movement of PS. Whether compensatory endocytosis of secretory granules in neuroendocrine cells requires the coordinated action of scramblase and P-type ATPase is to be investigated.

To conclude, activation of secretion in neuroendocrine cells triggers a calcium-dependent outward translocation of PS at the exocytotic site through the activation of scramblase 1. While this lipid reorganization does not regulate the exocytotic process *per se*, it appears as an essential step of compensatory endocytosis. By recruiting the clathrin machinery and/or generating a stable microdomain, PS translocation may preserve the secretory granule as an entity at the plasma membrane (see hypothetical model in Figure 7). Resolving the mechanisms specifically targeting scramblase 1 to the granule membrane or governing PS retrieval back to the inner leaflet and finally characterizing the precise functions of PS translocation in coupling the various modes exocytosis to compensatory endocytosis are now the next challenging questions.

Acknowledgements

We acknowledge the generosity of Dr P.J. Sims (University of Rochester, N.Y., USA), Dr. S. Nagamatsu (Kyorin University, Tokyo, Japan), Dr. S. Christophoridis (University of Ioannina, Greece), Dr. A. Benmerah (Institut Cochin, Paris, France) and Dr. P. Boquet (INSERM U627, Nice, France) for kindly providing GFP-PLSCR1, Phluorin-phogrin, GFP-CD39, GFP-Eps15^{EΔ95/295} and GPI-GFP constructs, respectively. We are grateful to Dr C. Sagné (IBPC, Paris, France) for generously providing anti-bovine VMAT2 antibodies. We thank Dr. N. Grant and Dr. N. Vitale for valuable comments on the manuscript. We thank Dr. M. Malacombe and F. Gambino for setting up preliminary experiments and T. Thahouly for technical assistance. This work was supported by a Human Frontier Science Program (HFSP) grant (RGY40-2003C) and an ANR grant (ANR-07-JCJC-088-01) to S.G. and by the “Fondation pour la Recherche Médicale” (FRM, fellowship to M.C.) We acknowledge the confocal and electron microscopy facilities of Plateforme Imagerie In Vitro of Neurosciences IFR 37 (Strasbourg).

Materials and Methods

Plasmids and short interference RNA.

The vectors pEGFP-RNAi and the plasmid coding for growth hormone were described previously (Gasman et al., 2004; Malacombe et al., 2006). The N-terminally GFP-tagged mouse scramble1 (PLSCR1) was a gift from Peter. J Sims (University of Rochester, N.Y., USA). GFP-PLSCR1^{D284A} was generated by site-directed mutagenesis using the QuickChange mutagenesis kit (Stratagene). GFP-Eps15_{EΔ95/295} mutant was kindly provided by Dr. Alexandre Benmerah (Institut Cochin, Paris, France). Phogrin-Phluorin, GPI-GFP and GFP-CD39 constructs were gifts from Dr. Nagamatsu (Kyorin University, Tokyo, Japan), P. Boquet (INSERM U627, Nice, France) and Dr. S. Christophoridis (University of Ioannina, Greece), respectively. The sequence of unrelated (UnR) siRNA was as reported (Randhawa et al., 2004). Bovine DNA fragment encoding the 21-nucleotide siRNA sequence AAGACCAAUUUCAGCAGACAG derived from the clathrin heavy chain transcript and separated from its reverse 21-nucleotide complement by a short spacer, were annealed and cloned in the BglII and HindIII sites in front of the H1 promoter of the pEGFP-N2-RNAi plasmid.

Culture and transfection.

Chromaffin and PC12 cells were cultured as described previously (Gasman et al., 1997, 2004). Mammalian expression vectors (3 μg, 5 x 10⁶ cells, 24-well dishes) were introduced into chromaffin cells by Amaxa Nucleofactor systems (Amaxa Biosystems) according to manufacturer's instructions. The transfection efficiency was 10-40%. Experiments were performed 24h/48 h after transfection. PC12 cells were transfected using GenePorter (Gene Therapy Systems) according to manufacturer's instructions (24-well dishes, 1x10⁵ cells, 0.5 μg of each plasmid /well). The transfection efficiency was 5-25%.

Growth hormone release from PC12 cells.

GH release experiments were performed 48h after transfection. PC12 cells were washed four times with Locke's solution (140 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 11 mM glucose and 15 mM Hepes, pH 7.2) and then incubated for 10 min in Locke's solution (basal release) or stimulated with an elevated K⁺ solution (Locke's containing 59 mM KCl and 85 mM NaCl). The supernatant was collected,

and the cells were harvested by scraping in 10 mM phosphate-buffered saline. The amounts of GH secreted into the medium and retained in the cells were measured using an ELISA assay (Roche). GH secretion is expressed as a percentage of total GH present in the cells before stimulation. In the figure, data are given as mean values \pm S.E.M. obtained in four independent experiments performed on four different cell cultures.

Internalization assays

For anti-DBH antibodies internalization, chromaffin cells were washed twice in Locke's solution and then incubated for 10 min at 37°C in calcium-free Locke's solution (resting) or stimulated with 10 μ M nicotine or with elevated K⁺ solution (Locke's solution containing 59 mM KCl and 85 mM NaCl). Cells were then placed on ice, washed once in Locke's solution and incubated for 1 h at 4°C in the presence of polyclonal anti-DBH antibodies (1/1000). Cells were then washed rapidly with Locke's solution and further incubated at 37°C for different time points (chase). Following the chase, cells were washed three times in Locke's solution and then fixed and processed for immunofluorescence as described previously (Gasman et al., 1998).

Antibodies, immunofluorescence, confocal microscopy and image analysis.

Monoclonal anti-clathrin heavy chain antibody was purchased from Sigma-Aldrich. The polyclonal anti-VMAT2 antibody was a gift from Dr. C. Sagné (IPCB, Paris, France). The polyclonal anti-DBH antibody was as described (Perrin and Aunis, 1985). Alexa Fluor-labeled secondary antibodies were obtained from Molecular Probes. For immunocytochemistry, chromaffin cells grown on fibronectin-coated glass coverslips were fixed and immunostained as described previously (Gasman et al., 1998).

For Annexin A5 binding, chromaffin cells were washed two times in Locke's solution and then incubated for 15 min at 37°C in the presence of Alexa Fluor 568-conjugated Annexin A5 (Molecular probes) in Locke's solution (resting) or in Locke's solution containing a depolarizing concentration of potassium (stimulated). Cells were then fixed and annexin A5 staining was analysed by confocal microscopy.

Stained cells were visualized using a confocal microscope LSM 510 (Carl Zeiss, Jena, Germany). Using the Zeiss CLSM instrument software 3.2, the amount of clathrin, transferrin or annexin A5 labeling 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 signal detected in cells. The proportion of clathrin or annexin A5 co-localized with DBH was estimated from the double-labeled pixels, expressed as the average fluorescence intensity normalized to the corresponding surface area, and calculated as a percentage of the total clathrin/annexin A5 fluorescence detected in each cell.

Vesicle distribution analysis by Euclidean Distance Map

Euclidean distance map (EDM) to calculate within cells distances between two objects has been previously described (Schober et al., 2007). Details are given in the legend of supplementary Figure S1.

Pre-embedding Immunoelectron Microscopy.

Chromaffin cells were kept under resting conditions or stimulated with 10 μ M nicotine for 10 min and incubated for 1 h at 4°C with polyclonal anti-DBH antibodies (1/1000). The cells were then either directly fixed or chased at 37°C for 1 and 5 min. Fixation was performed for 30 min in 4% paraformaldehyde and 0.3-1% glutaraldehyde in 0.1M sodium/phosphate, pH 7.3. After permeabilization with 0.05-0.1% Triton X-100 for 15 min, the anti-DBH antibodies were revealed by a classical silver-intensified immunogold method (Yi et al., 2001), using an ultrasmall gold-bound secondary antibody (Aurion).

Data analysis

In all the figures, data are given as the mean values \pm S.E.M. obtained at least four independent experiments performed on different cell cultures. n represents the number of experiments or the number of cells analysed. Data were analysed with Minitab® statistical software. Statistical significance has been established using ANOVA test and data were considered significantly different when p value was lower than 0.05. Gaussian distribution and variance equality of the data were verified.

References

- Acharya, U., Edwards, M.B., Jorquera, R.A., Silva, H., Nagashima, K., Labarca, P. and Acharya, J.K. (2006) *Drosophila melanogaster* Scramblases modulate synaptic transmission. *J Cell Biol*, **173**, 69-82.
- Allersma, M.W., Wang, L., Axelrod, D. and Holz, R.W. (2004) Visualization of regulated exocytosis with a granule-membrane probe using total internal reflection microscopy. *Mol Biol Cell*, **15**, 4658-4668.
- Arac, D., Chen, X., Khant, H.A., Ubach, J., Ludtke, S.J., Kikkawa, M., Johnson, A.E., Chiu, W., Sudhof, T.C. and Rizo, J. (2006) Close membrane-membrane proximity induced by Ca²⁺-dependent multivalent binding of synaptotagmin-1 to phospholipids. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 209-217.
- Artalejo, C.R., Elhamdani, A. and Palfrey, H.C. (2002) Sustained stimulation shifts the mechanism of endocytosis from dynamin-1-dependent rapid endocytosis to clathrin- and dynamin-2-mediated slow endocytosis in chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 6358-6363.
- Artalejo, C.R., Henley, J.R., McNiven, M.A. and Palfrey, H.C. (1995) Rapid endocytosis coupled to exocytosis in adrenal chromaffin cells involves Ca²⁺, GTP, and dynamin but not clathrin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 8328-8332.
- Basse, F., Stout, J.G., Sims, P.J. and Wiedmer, T. (1996) Isolation of an erythrocyte membrane protein that mediates Ca²⁺-dependent transbilayer movement of phospholipid. *J Biol Chem*, **271**, 17205-17210.
- Benmerah, A., Bayrou, M., Cerf-Bensussan, N. and Dautry-Varsat, A. (1999) Inhibition of clathrin-coated pit assembly by an Eps15 mutant. *J Cell Sci*, **112 (Pt 9)**, 1303-1311.
- Chan, S.A. and Smith, C. (2003) Low frequency stimulation of mouse adrenal slices reveals a clathrin-independent, protein kinase C-mediated endocytic mechanism. *J Physiol*, **553**, 707-717.
- Chasserot-Golaz, S., Vitale, N., Umbrecht-Jenck, E., Knight, D., Gerke, V. and Bader, M.F. (2005) Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Mol Biol Cell*, **16**, 1108-1119.
- de Diego, A.M., Gandia, L. and Garcia, A.G. (2008) A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla. *Acta Physiol (Oxf)*, **192**, 287-301.
- Demo, S.D., Masuda, E., Rossi, A.B., Thronset, B.T., Gerard, A.L., Chan, E.H., Armstrong, R.J., Fox, B.P., Lorens, J.B., Payan, D.G., Scheller, R.H. and Fisher, J.M. (1999) Quantitative measurement of mast cell degranulation using a novel flow cytometric annexin-V binding assay. *Cytometry*, **36**, 340-348.
- Devaux, P.F. (2000) Is lipid translocation involved during endo- and exocytosis? *Biochimie*, **82**, 497-509.
- Devaux, P.F., Lopez-Montero, I. and Bryde, S. (2006) Proteins involved in lipid translocation in eukaryotic cells. *Chem Phys Lipids*, **141**, 119-132.
- Diril, M.K., Wienisch, M., Jung, N., Klingauf, J. and Haucke, V. (2006) Stonin 2 is an AP-2-dependent endocytic sorting adaptor for synaptotagmin internalization and recycling. *Dev Cell*, **10**, 233-244.
- Doreian, B.W., Fulop, T.G. and Smith, C.B. (2008) Myosin II activation and actin reorganization regulate the mode of quantal exocytosis in mouse adrenal chromaffin cells. *J Neurosci*, **28**, 4470-4478.
- Elhamdani, A., Azizi, F. and Artalejo, C.R. (2006) Double patch clamp reveals that transient fusion (kiss-and-run) is a major mechanism of secretion in calf adrenal chromaffin cells: high calcium shifts the mechanism from kiss-and-run to complete fusion. *J Neurosci*, **26**, 3030-3036.

- Fulop, T., Radabaugh, S. and Smith, C. (2005) Activity-dependent differential transmitter release in mouse adrenal chromaffin cells. *J Neurosci*, **25**, 7324-7332.
- Fulop, T. and Smith, C. (2006) Physiological stimulation regulates the exocytic mode through calcium activation of protein kinase C in mouse chromaffin cells. *Biochem J*, **399**, 111-119.
- Fulop, T. and Smith, C. (2007) Matching native electrical stimulation by graded chemical stimulation in isolated mouse adrenal chromaffin cells. *J Neurosci Methods*, **166**, 195-202.
- Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., Hubert, P., Aunis, D. and Bader, M.F. (1998) Identification of a potential effector pathway for the trimeric Go protein associated with secretory granules. Go stimulates a granule-bound phosphatidylinositol 4-kinase by activating RhoA in chromaffin cells. *J Biol Chem*, **273**, 16913-16920.
- Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., 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**, 520-531.
- Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., Popoff, M.R., Aunis, D. and Bader, M.F. (1997) Trimeric G proteins control exocytosis in chromaffin cells. Go regulates the peripheral actin network and catecholamine secretion by a mechanism involving the small GTP-binding protein Rho. *J Biol Chem*, **272**, 20564-20571.
- Geisow, M.J., Childs, J. and Burgoyne, R.D. (1985) Cholinergic stimulation of chromaffin cells induces rapid coating of the plasma membrane. *Eur J Cell Biol*, **38**, 51-56.
- Gong, L.W., de Toledo, G.A. and Lindau, M. (2007) Exocytotic catecholamine release is not associated with cation flux through channels in the vesicle membrane but Na⁺ influx through the fusion pore. *Nat Cell Biol*, **9**, 915-922.
- Graham, M.E., O'Callaghan, D.W., McMahon, H.T. and Burgoyne, R.D. (2002) Dynamin-dependent and dynamin-independent processes contribute to the regulation of single vesicle release kinetics and quantal size. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7124-7129.
- Henkel, A.W. and Almers, W. (1996) Fast steps in exocytosis and endocytosis studied by capacitance measurements in endocrine cells. *Curr Opin Neurobiol*, **6**, 350-357.
- Holroyd, P., Lang, T., Wenzel, D., De Camilli, P. and Jahn, R. (2002) Imaging direct, dynamin-dependent recapture of fusing secretory granules on plasma membrane lawns from PC12 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 16806-16811.
- Ikeda, M., Kihara, A. and Igarashi, Y. (2006) Lipid asymmetry of the eukaryotic plasma membrane: functions and related enzymes. *Biol Pharm Bull*, **29**, 1542-1546.
- Kato, N., Nakanishi, M. and Hirashima, N. (2002) Transbilayer asymmetry of phospholipids in the plasma membrane regulates exocytotic release in mast cells. *Biochemistry*, **41**, 8068-8074.
- Lee, D., Hirashima, N. and Kirino, Y. (2000) Rapid transbilayer phospholipid redistribution associated with exocytotic release of neurotransmitters from cholinergic nerve terminals isolated from electric ray *Narke japonica*. *Neurosci Lett*, **291**, 21-24.
- Llobet, A., Wu, M. and Lagnado, L. (2008) The mouth of a dense-core vesicle opens and closes in a concerted action regulated by calcium and amphiphysin. *J Cell Biol*, **182**, 1017-1028.
- Mackler, J.M. and Reist, N.E. (2001) Mutations in the second C2 domain of synaptotagmin disrupt synaptic transmission at *Drosophila* neuromuscular junctions. *J Comp Neurol*, **436**, 4-16.
- Malacombe, M., Ceridono, M., Calco, V., Chasserot-Golaz, S., McPherson, P.S., Bader, M.F. and Gasman, S. (2006) Intersectin-1L nucleotide exchange factor regulates secretory granule exocytosis by activating Cdc42. *Embo J*, **25**, 3494-3503.

- Manno, S., Takakuwa, Y. and Mohandas, N. (2002) Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 1943-1948.
- Nossal, R. (2001) Energetics of clathrin basket assembly. *Traffic*, **2**, 138-147.
- Ohara-Imaizumi, M., Nakamichi, Y., Tanaka, T., Katsuta, H., Ishida, H. and Nagamatsu, S. (2002) Monitoring of exocytosis and endocytosis of insulin secretory granules in the pancreatic beta-cell line MIN6 using pH-sensitive green fluorescent protein (pHluorin) and confocal laser microscopy. *Biochem J*, **363**, 73-80.
- Patzak, A., Bock, G., Fischer-Colbrie, R., Schauenstein, K., Schmidt, W., Lingg, G. and Winkler, H. (1984) Exocytotic exposure and retrieval of membrane antigens of chromaffin granules: quantitative evaluation of immunofluorescence on the surface of chromaffin cells. *J Cell Biol*, **98**, 1817-1824.
- Patzak, A. and Winkler, H. (1986) Exocytotic exposure and recycling of membrane antigens of chromaffin granules: ultrastructural evaluation after immunolabeling. *J Cell Biol*, **102**, 510-515.
- Perrais, D., Kleppe, I.C., Taraska, J.W. and Almers, W. (2004) Recapture after exocytosis causes differential retention of protein in granules of bovine chromaffin cells. *J Physiol*, **560**, 413-428.
- Puri, N. and Roche, P.A. (2006) Ternary SNARE complexes are enriched in lipid rafts during mast cell exocytosis. *Traffic*, **7**, 1482-1494.
- Randhawa, V.K., Thong, F.S., Lim, D.Y., Li, D., Garg, R.R., Rudge, R., Galli, T., Rudich, A. and Klip, A. (2004) Insulin and hypertonicity recruit GLUT4 to the plasma membrane of muscle cells by using N-ethylmaleimide-sensitive factor-dependent SNARE mechanisms but different v-SNAREs: role of TI-VAMP. *Mol Biol Cell*, **15**, 5565-5573.
- Rizzoli, S.O. and Jahn, R. (2007) Kiss-and-run, collapse and 'readily retrievable' vesicles. *Traffic*, **8**, 1137-1144.
- Sagne, C., Isambert, M.F., Vandekerckhove, J., Henry, J.P. and Gasnier, B. (1997) The photoactivatable inhibitor 7-azido-8-iodoketanserin labels the N terminus of the vesicular monoamine transporter from bovine chromaffin granules. *Biochemistry*, **36**, 3345-3352.
- Salaun, C., Gould, G.W. and Chamberlain, L.H. (2005) Lipid raft association of SNARE proteins regulates exocytosis in PC12 cells. *J Biol Chem*, **280**, 19449-19453.
- Sankaranarayanan, S. and Ryan, T.A. (2000) Real-time measurements of vesicle-SNARE recycling in synapses of the central nervous system. *Nat Cell Biol*, **2**, 197-204.
- Schober, M., Raghavan, S., Nikolova, M., Polak, L., Pasolli, H.A., Beggs, H.E., Reichardt, L.F. and Fuchs, E. (2007) Focal adhesion kinase modulates tension signaling to control actin and focal adhesion dynamics. *J Cell Biol*, **176**, 667-680.
- Shahin, V., Datta, D., Hui, E., Henderson, R.M., Chapman, E.R. and Edwardson, J.M. (2008) Synaptotagmin perturbs the structure of phospholipid bilayers. *Biochemistry*, **47**, 2143-2152.
- Sims, P.J. and Wiedmer, T. (2001) Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling. *Thromb Haemost*, **86**, 266-275.
- Smith, C. and Neher, E. (1997) Multiple forms of endocytosis in bovine adrenal chromaffin cells. *J Cell Biol*, **139**, 885-894.
- Smrz, D., Lebduska, P., Draberova, L., Korb, J. and Draber, P. (2008) Engagement of phospholipid scramblase 1 in activated cells: implication for phosphatidylserine externalization and exocytosis. *J Biol Chem*, **283**, 10904-10918.
- Taraska, J.W., Perrais, D., Ohara-Imaizumi, M., Nagamatsu, S. and Almers, W. (2003) Secretory granules are recaptured largely intact after stimulated exocytosis in cultured endocrine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2070-2075.

- Tsuboi, T. and Rutter, G.A. (2003) Multiple forms of "kiss-and-run" exocytosis revealed by evanescent wave microscopy. *Curr Biol*, **13**, 563-567.
- van Meer, G., Voelker, D.R. and Feigenson, G.W. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 112-124.
- 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.
- Wick, P.F., Trenkle, J.M. and Holz, R.W. (1997) Punctate appearance of dopamine-beta-hydroxylase on the chromaffin cell surface reflects the fusion of individual chromaffin granules upon exocytosis. *Neuroscience*, **80**, 847-860.
- Yi, H., Leunissen, J., Shi, G., Gutekunst, C. and Hersch, S. (2001) A novel procedure for pre-embedding double immunogold-silver labeling at the ultrastructural level. *J Histochem Cytochem*, **49**, 279-284.
- Zachowski, A., Henry, J.P. and Devaux, P.F. (1989) Control of transmembrane lipid asymmetry in chromaffin granules by an ATP-dependent protein. *Nature*, **340**, 75-76.
- Zhou, Q., Sims, P.J. and Wiedmer, T. (1998) Identity of a conserved motif in phospholipid scramblase that is required for Ca²⁺-accelerated transbilayer movement of membrane phospholipids. *Biochemistry*, **37**, 2356-2360.

Figure Legends

Fig. 1. The secretory granule membrane protein DBH is efficiently internalized after exocytosis.

(A) Schematic representation of DBH internalization assay in chromaffin cells. Exocytosis and fusion gives accessibility to the lumen of the large dense-core granules. Thus, the granule-associated DBH protein becomes accessible to anti-DBH antibodies present in the extracellular medium. A subsequent chase at 37°C allows internalization of the DBH/anti-DBH complexes and thereby permits to follow the fate of retrieved granule membrane. (B, C) Kinetics of DBH internalization obtained by immunocytochemistry and Euclidean distance map analysis. Chromaffin cells maintained in resting conditions or stimulated for 10 min with 10 μ M nicotine were incubated for 1 h at 4°C in the presence of rabbit anti-DBH antibodies. Cells were then chased at 37°C for the indicated time periods to permit the internalization of DBH/anti-DBH complexes prior to fixation and immunofluorescence procedure. DBH staining was revealed with Alexa-488-conjugated anti-rabbit antibodies. Bar: 5 μ m. The histogram represents the percentage of DBH-labelled vesicles localized in the cytosol or present at the plasma membrane as given by Euclidean distance map analysis. Data are the mean values \pm S.E.M. (n= 30 cells).

Fig. 2. Ultrastructural immunogold localization of DBH in chromaffin cells.

Chromaffin cells maintained in resting conditions (A) or stimulated for 10 min with 10 μ M nicotine were incubated for 1 h at 4°C in the presence of rabbit anti-DBH antibodies to detect exocytotic sites (arrows and insets in B). Cells were then either fixed (B) or chased at 37°C for 1 min (C, D) or 5 min (E) to allow internalization of DBH/anti-DBH complexes prior to fixation and silver-intensified immunogold detection. Note the progressive localization of DBH-bound gold particles at invaginated membranes (C,D) and internalized vesicles in peripheral cytoplasm (E).

Fig. 3. Secretory granules fuse and are recaptured without mixing with the plasma membrane.

Chromaffin cells expressing GPI-GFP were maintained in resting conditions or stimulated for 10 min with 59 mM K⁺. Cells were then incubated for 1 h at 4°C in the presence of rabbit

anti-DBH antibodies to detect exocytotic sites. Cells were subsequently fixed or chased at 37°C for 15 min prior to fixation to permit granule membrane internalization. DBH staining was revealed with Alexa-555-conjugated anti-rabbit antibodies. Bar: 5 μ m. Note that GPI-GFP neither co-localized with cell surface DBH patches (Stimulated) nor with internalized DBH spots (Chase 15 min).

Fig. 4. Phospholipid scramblase 1 is involved in the outward translocation of PS that occurs at the exocytotic sites in secretagogue-stimulated cells.

(A) Chromaffin cells were stimulated for 10 min with 59 mM K^+ in the presence of Alexa 568-conjugated annexin A5 and polyclonal anti-DBH antibodies. Cells were then fixed and processed for immunofluorescence and confocal microscopy. Anti-DBH was revealed with Alexa-488-conjugated anti-rabbit antibodies. Bar: 5 μ m. (B) Chromaffin cells transfected to express PLSCR1 WT-GFP or PLSCR1 D284A-GFP were stimulated for 10 min with 59 mM K^+ in the presence of Alexa 568-conjugated annexin A5 and then fixed. Cells were processed for immunofluorescence and analyzed by confocal microscopy. Bar: 5 μ m. (C) Semi-quantitative analysis of cell surface annexin A5 binding in non-transfected cells and cells expressing PLSCR1 WT-GFP or PLSCR1 D284A-GFP. Data are given as the mean values \pm S.E.M. (n= 20 cells).

Fig. 5. Ca^{2+} -dependent phospholipid scramblase 1 is not required for exocytosis but for granule membrane compensatory endocytosis.

(A) Chromaffin cells expressing PLSCR1 WT-GFP or PLSCR1 D284A-GFP were stimulated with 59 mM K^+ and incubated for 1 h at 4°C in the presence of rabbit anti-DBH antibodies to detect exocytotic sites. Cells were then fixed and processed for immunofluorescence and confocal microscopy. DBH staining was revealed with Alexa 555-conjugated anti-rabbit antibodies. Transfected cells are indicated with an arrow. Bar: 5 μ m. (B) PC12 cells co-transfected with pGHSuper and pEGFP (Control), PLSCR1 WT-GFP or PLSCR1 D284A-GFP were washed and subsequently incubated for 10 min in Locke's solution (basal) or stimulated for 10 min with 59 mM K^+ , and processed for GH release assay. Data are given as the mean values \pm S.E.M. n=4, NS (not significant) compared to control cells (ANOVA). (C) Chromaffin cells expressing PLSCR1 WT-GFP or PLSCR1 D284A-GFP were stimulated with 59 mM K^+ , incubated with rabbit anti-DBH antibodies and chased for 30 min to allow DBH internalization. Transfected cells are indicated with an arrow. Bar: 5 μ m. (D) EDM analysis giving the percentage of DBH-labelled vesicles present at the plasma membrane or in

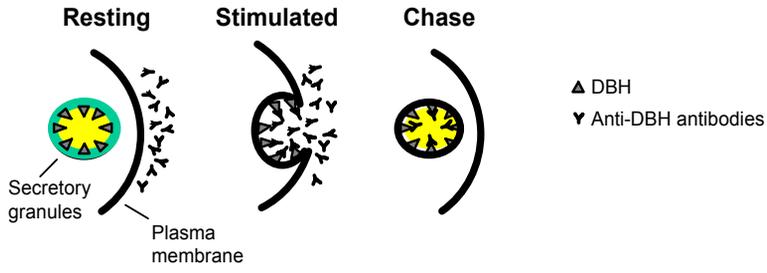
the cytoplasm. Data are given as the mean values \pm S.E.M. n=25 cells, ***P<0.001 (ANOVA).

Fig. 6. Scramblase-mediated PS translocation partially inhibits clathrin recruitment at the sites of exocytosis. Secretory granule membrane retrieval is a clathrin-dependent process(A-D). Chromaffin cells transfected with either pEGFP-RNAi (control), pEGFP-unR siRNA or clathrin siRNA, or with pEGFP (control) or GFP-Eps15 E Δ 95/295, were stimulated for 10 min with 59 mM K⁺ and then incubated for 1 h at 4°C with rabbit anti-DBH antibodies. Cells were then either directly fixed (Stimulated) or chased for 15 min at 37°C, and processed for immunofluorescence using Alexa-555-conjugated anti-rabbit antibodies. (A, B) Confocal images showing examples of DBH-labelled exocytotic sites at the plasma membrane (Stimulated) and DBH internalisation (Chase) in cells expressing clathrin siRNA or Eps15 E Δ 95/295. Transfected cells are indicated with an arrow. Bar: 5 μ m. (C, D) Analysis representing the percentage of DBH-labelled vesicles present at the plasma membrane or in the cytoplasm, as determined by EDM. Data are given as the mean values \pm S.E.M. (n= 20 cells). In C, ***P<0.001, NS (not significant) compared to control cells (ANOVA). In D, ***P<0.001 (ANOVA). (E-F) Chromaffin cells were transfected for 48 h to express PLSCR1 WT-GFP or PLSCR1 D284A-GFP. Cells were then stimulated with 59 mM K⁺ and incubated for 1 h at 4°C with rabbit anti-DBH antibodies to detect exocytotic sites. Cells were then fixed and processed for immunofluorescence with the anti-clathrin antibodies. DBH and clathrin were revealed with Alexa-647-conjugated anti-rabbit antibodies and Alexa-555-conjugated anti-mouse antibodies, respectively. Bar: 5 μ m. (F) Histogram representing a semi-quantitative analysis of the percentage of clathrin co-localizing with cell surface DBH in non-transfected cells or cells expressing PLSCR1 proteins. Data are given as the mean values \pm S.E.M. n=25 cells, ***P<0.001, NS (not significant) compared to control cells (ANOVA)

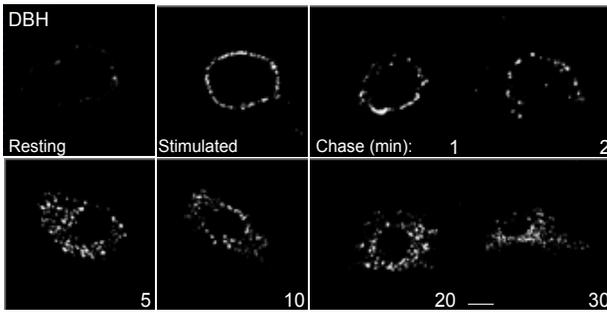
Fig. 7. Hypothetical model.

Stimulation with a secretagogue (Nicotine or 59 mM K⁺) elevates cytosolic Ca²⁺ and triggers exocytosis and fusion of secretory granules with the plasma membrane. Ca²⁺ activates a phospholipid scramblase activity, which catalyzes lipid scrambling in the granule membrane fused with the plasma membrane and results in the external appearance of PS at the sites of exocytosis. Clathrin molecules are then transiently recruited for specific retrieval of the granule membrane.

A



B



C

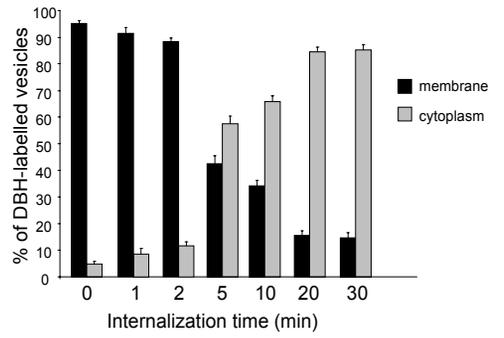


Figure 1. Ceridono et al.

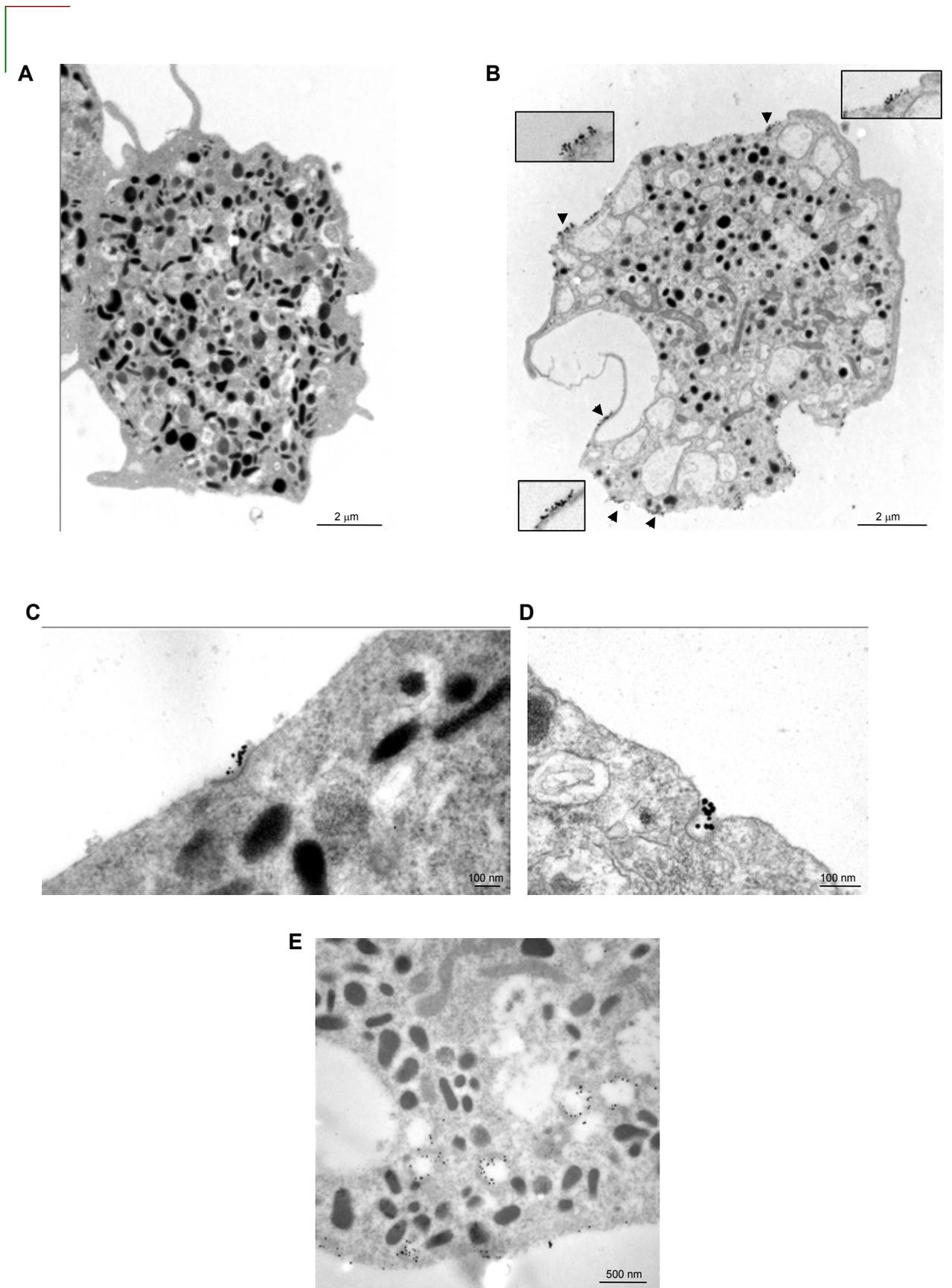


Figure 2. Ceridono et al.

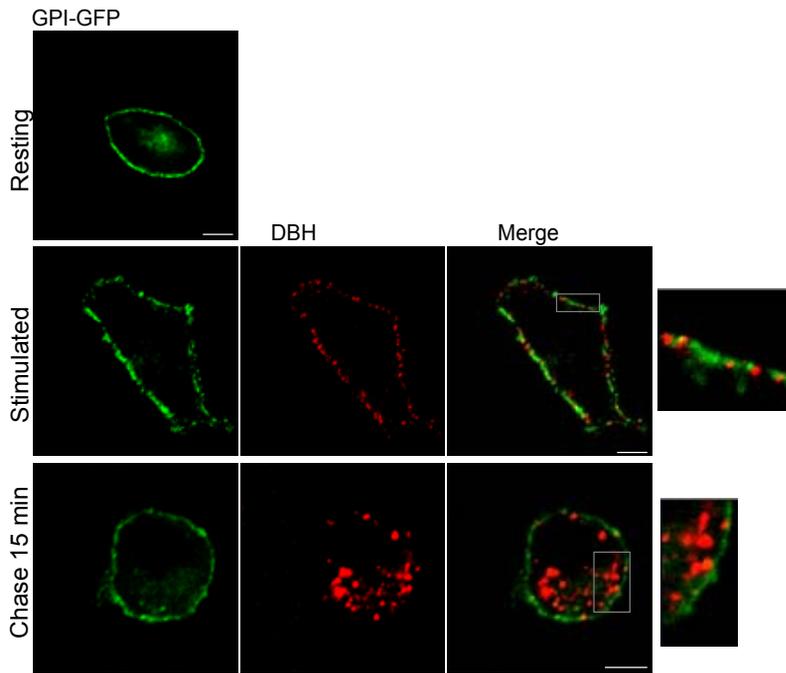


Figure 3. Ceridono et al.

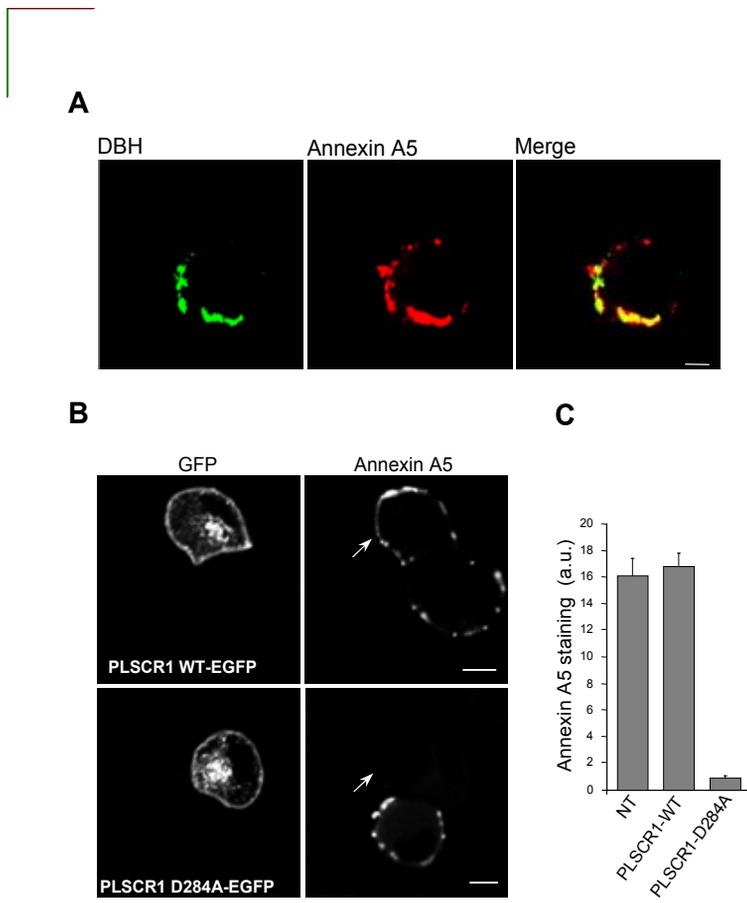


Figure 4. Ceridono et al.

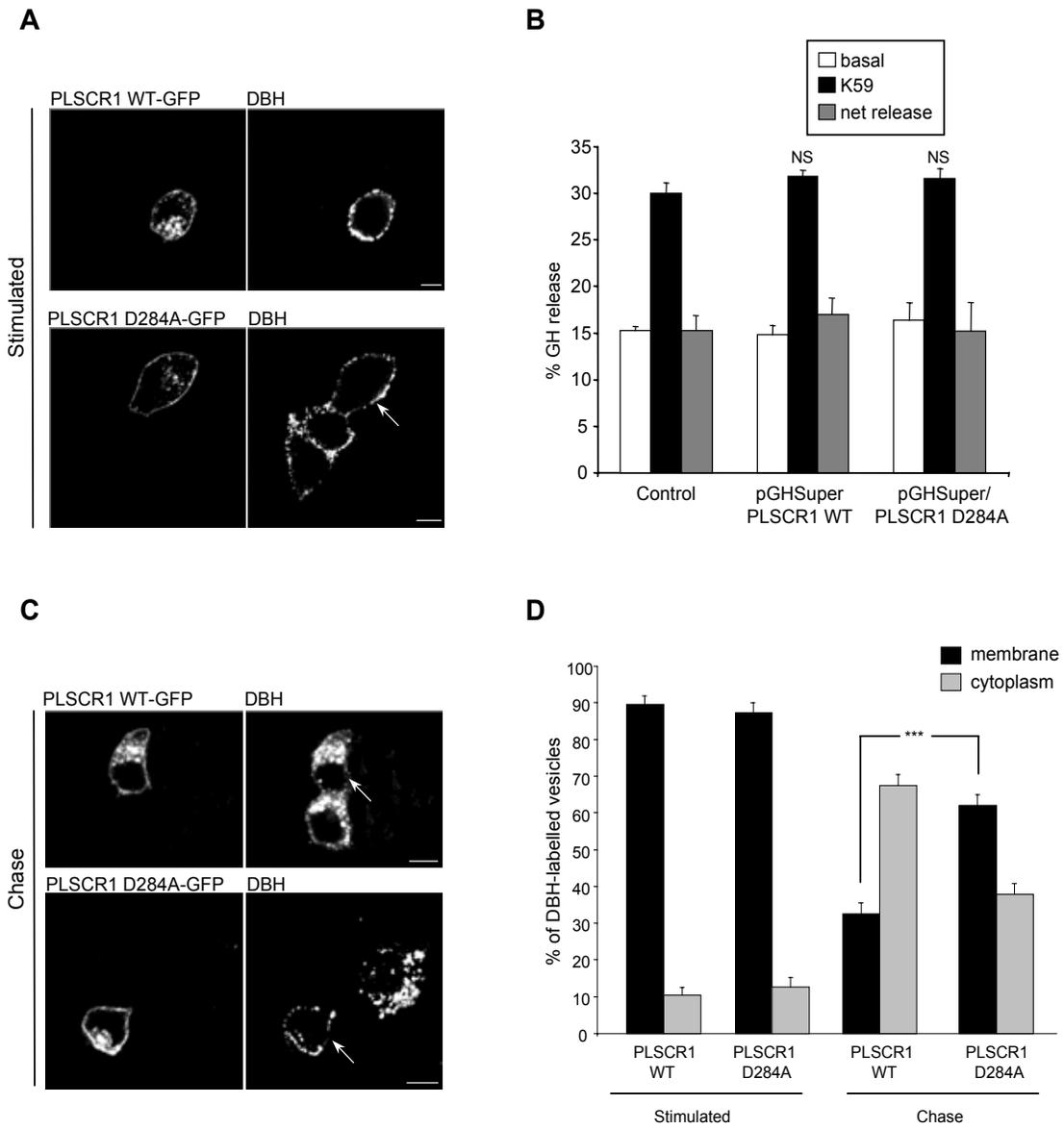


Figure 5. Ceridono et al.

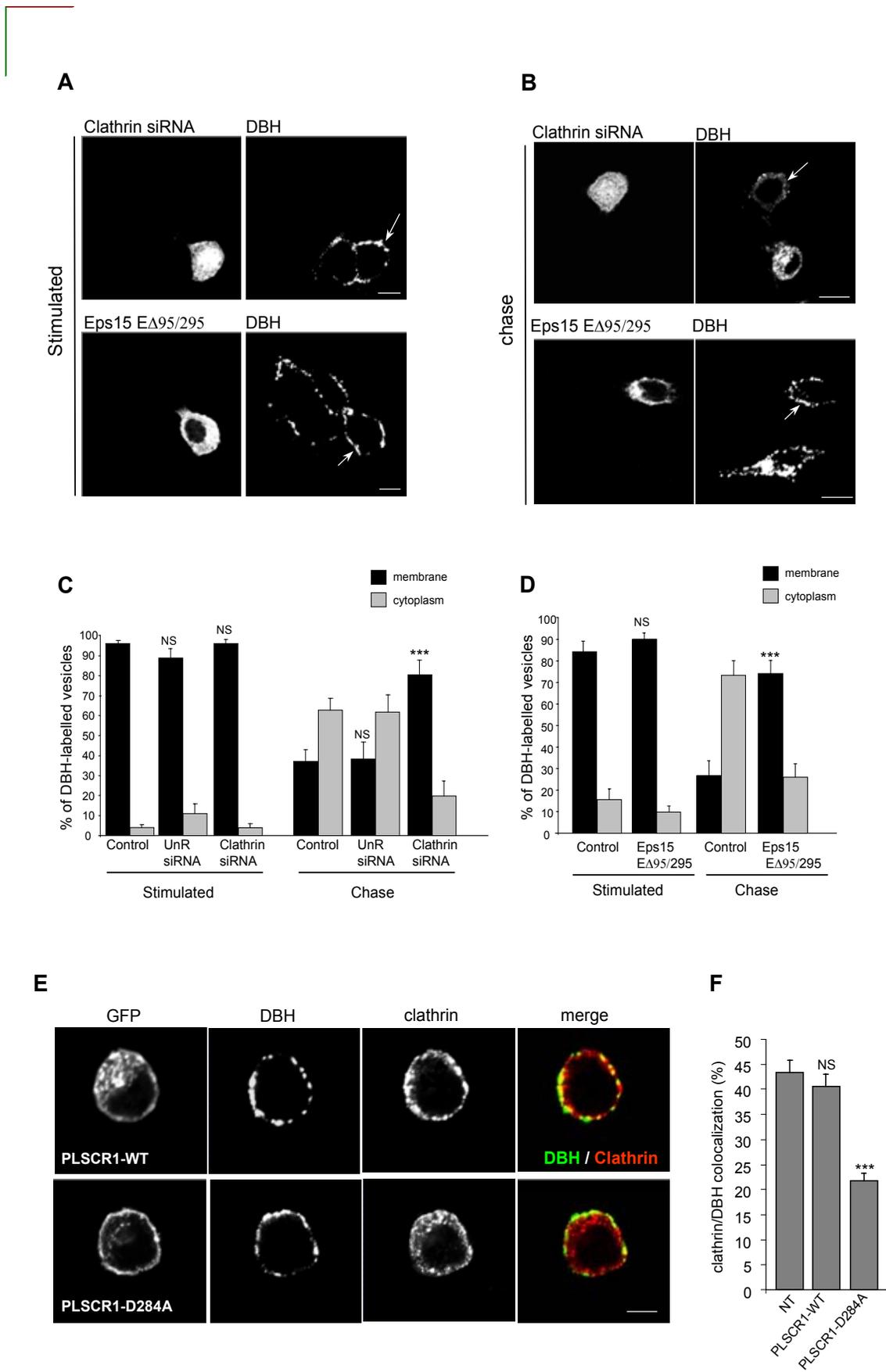


Figure 6. Ceridono et al.

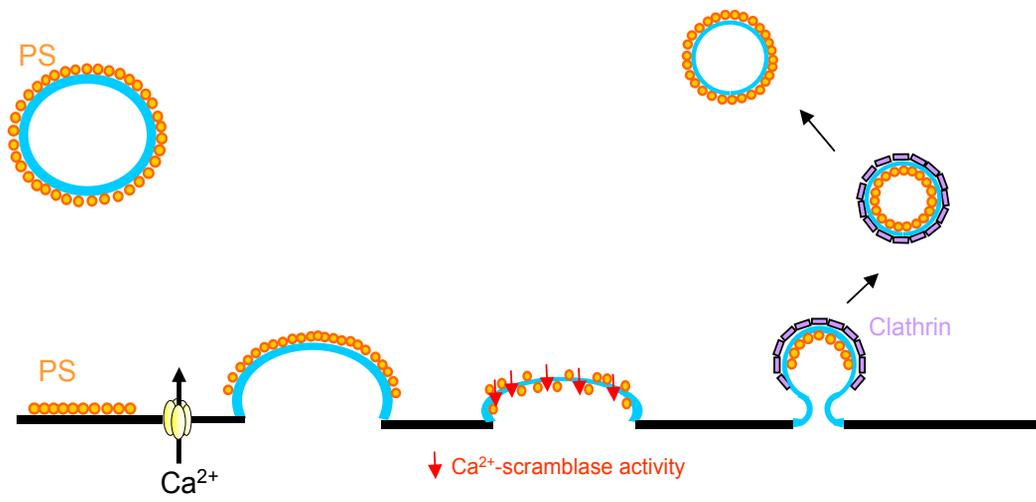
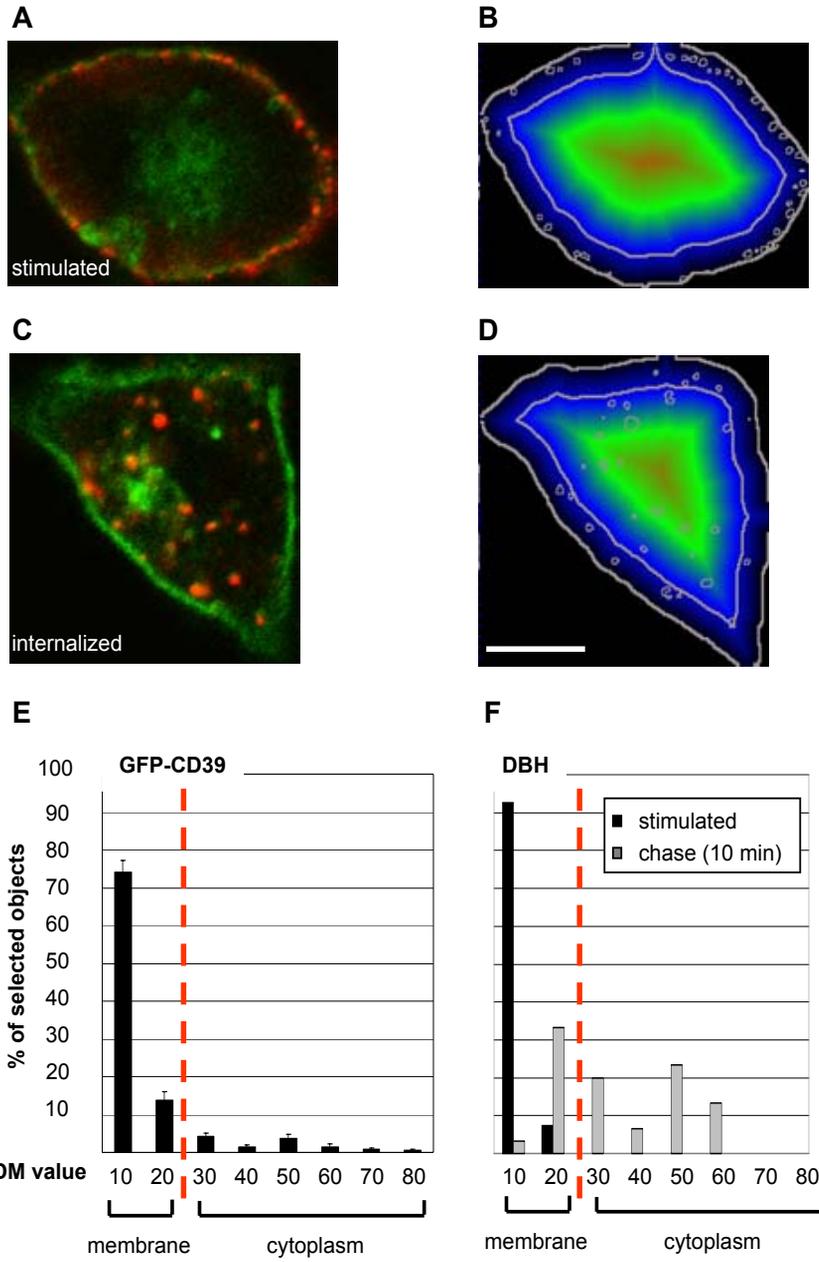


Figure 7. Ceridono et al.



Supplementary Figure S1. Ceridono et al.

Figure S1. Distribution of DBH-containing vesicles determined by Euclidean distance map (EDM).

Euclidean distance map (EDM) approach has been previously used for calculating relative distances between objects in cell biology (Schober et al., 2007). This technique is based on Euclidean distance transformation that convert a digital binary image consisting of object (foreground) and non-object (background) pixels into another image where each pixel has a value of the minimum Euclidean distance from non-object pixels (Shih and Wu, 2004).

In the present example, chromaffin cells transfected with plasmids encoding GFP-tagged ATP receptors (GFP-CD39) were stimulated for 10 min with 59 mM K⁺. Cells were incubated for 1 h at 4°C in the presence of rabbit anti-DBH antibodies and either fixed or chased at 37°C for different times to allow the internalization of DBH/anti-DBH complexes. Cells were then processed for immunofluorescence and confocal microscopy analysis. DBH staining was revealed with Alexa-555-conjugated anti-rabbit antibodies. Firstly, the confocal image (1024x1024, objective x63 N/A 1.3) was treated to improve detection of DBH-labelled vesicles and separation of nearby vesicles. We applied a gauss blur (sigma radius =2) and subtracted the generated image from the original one. The remaining signal was then enhanced based on 3D Laplacian and Gaussian transform with filter size in x and y direction fixed at 1.5 (enhance spots function of the MRI Cell Image Analyzer; Baecker and Travo, 2006). We took advantage of the round morphology of vesicles to restore them by using a bottom hat gray transform on the 32 bit image (radius=4 and circle as structuring element). We compared the final image with the original one to ensure that there were in good correlation. Threshold was applied to select vesicles and each selected vesicle was transformed into a region of interest (ROI).

The cell periphery was selected by delineating the cell boundary based on the GFP-CD39 or endogenous SNAP25 signal for each individual cell. A binary picture was then generated from the selection, inverted and converted into an EDM. The EDM displays the closest distance of any point within the objects (the cell) and the area surrounding the object (plasma membrane) as a grey intensity value. Regions demarcating each DBH-positive vesicles (vesicle ROI) of a given cell were then transferred on the EDM where the mean grey value of each individual vesicle corresponded to its relative distance from the cell periphery.

(A, C) Representative pictures of chromaffin cells stained for DBH (red) and GFP-CD39 (green) in stimulated (A) or internalized conditions (C). (B, D) The corresponding EDM was converted into a rainbow look-up table for clarity reasons. The position of the

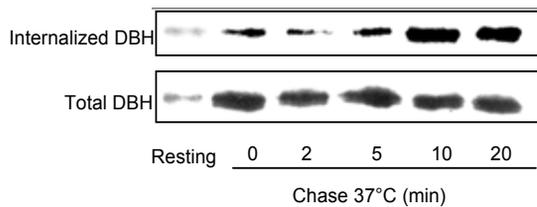
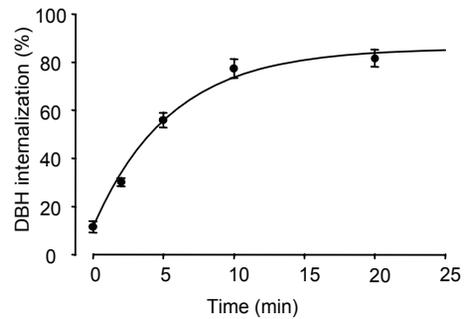
DBH-stained regions and 2 lines representing EDM value = 1 (cell boundary) and EDM value = 20 (cell periphery) are represented on the EDM. Bar = 5 μ m. (E) Distribution of GFP-CD39 as determined by EDM in stimulated cells. 13 cells were analyzed. $88\% \pm 2.2\%$ of the labelling was found to localize at a distance range corresponding to EDM value between 1 and 20. (F) Distribution of DBH-labelled vesicles measured as shown in B and D. Red dotted line represents the cut-off applied to estimate the percentage of DBH-labelled vesicles close to the cell membrane (100% in stimulated cells versus 37% after 10 min of chase).

All the image treatments were done using ImageJ software implemented with the visual scripting interface MRI Cell Image Analyzer (Baecker and Travo, 2006).

Baecker, V. and P. Travo. 2006. Cell Image Analyzer - A visual scripting interface for ImageJ and its usage at the microscopy facility Montpellier RIO Imaging. *Proceedings of the ImageJ User and Developer Conference*, 1, 105-110.

Schober, M., S. Raghavan, M. Nikolova, L. Polak, H.A. Pasolli, H.E. Beggs, L.F. Reichardt, and E. Fuchs. 2007. Focal adhesion kinase modulates tension signaling to control actin and focal adhesion dynamics. *J. Cell Biol.* 176:667-680.

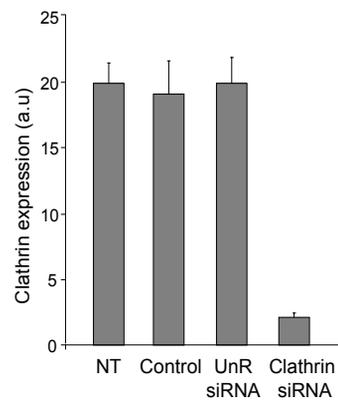
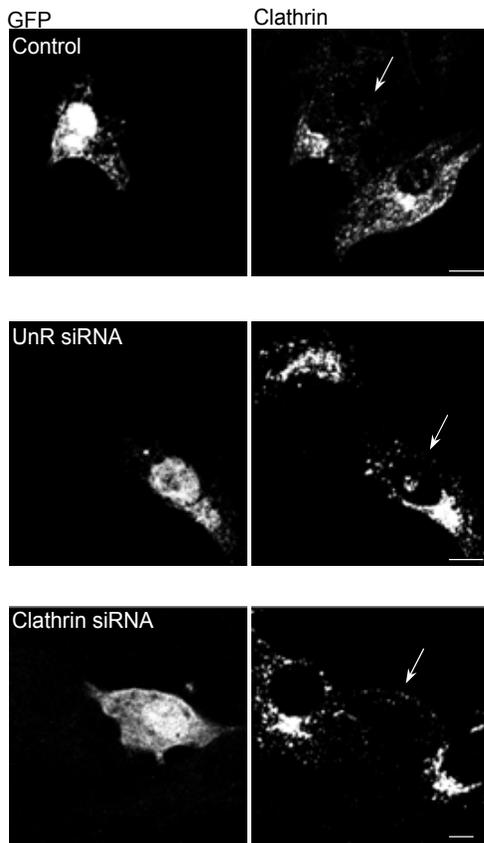
Shih, F.Y., and Y.T. Wu. 2004. The efficient algorithms for achieving Euclidean distance transformation. *IEEE Trans. Image Process.* 13:1078-1091.

A**B**

Supplementary Figure S2. Kinetics of DBH internalization obtained by cell-surface biotinylation assay. Chromaffin cells maintained in resting conditions or stimulated for 10 min with 10mM nicotine were subjected to cell surface biotinylation and internalization assay for the indicated periods of time. Both total and internalized biotinylated-DBH were revealed by Western Blot (A). Time course of DBH internalization obtained by calculating the percentage of internalized-DBH relative to total DBH (internalized + non internalized) from the values obtained by scanning densitometry analysis (B). Data are the mean values \pm S.E.M. (n=5).

Method for the DBH internalization after cell surface biotinylation: chromaffin cells, grown in 10-cm Petri dishes, were maintained under resting condition or stimulated for 10 min with 10 mM nicotine. Following stimulation, biotinylation of cell surface proteins was performed using the “Pinpoint™ Cell Surface Protein Isolation Kit” (Pierce). Briefly, cells were washed twice with ice-cold PBS and then incubated with Sulfo-NHS-SS-Biotin (0.25 mg/ml) for 30 min at 4°C. Cells were then washed and further incubated at 37°C for different time points (chase). Cell cultures for determining total biotinylated DBH (internalized + non-internalized) and background labeling were left on ice. In all other samples, cell surface biotin was cleaved off with 50 mM glutathione solution. All the cells were then washed and lysed in a buffer containing 1% Triton X-100, 50 mM Hepes pH 7.5, 1.5 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 1% glycerol, supplemented with protease inhibitors. Biotinylated proteins were then precipitated by incubating lysates with neutravidin beads (Pierce) for 1 h at room temperature. The precipitated biotinylated-DBH was resolved on 12% polyacrylamide-SDS gels and immunoblotted with anti-DBH antibodies. Blots were processed using the Super Signal detection system (Pierce). Immunoreactive bands from Western Blot were quantified using Image J 1.29x software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD). DBH densities from total biotinylated samples and glutathione-treated samples (representing the internalized DBH pool) were analyzed. The percentage of internalization was determined, for each time point, by the density of internalized DBH compared to that of total biotinylated DBH.

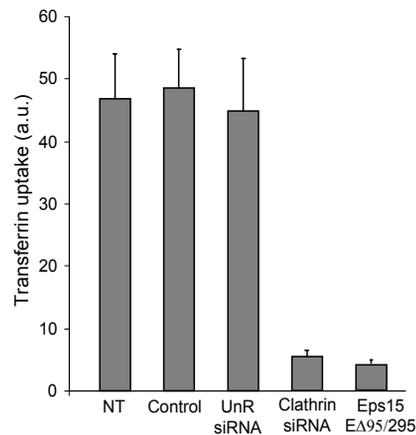
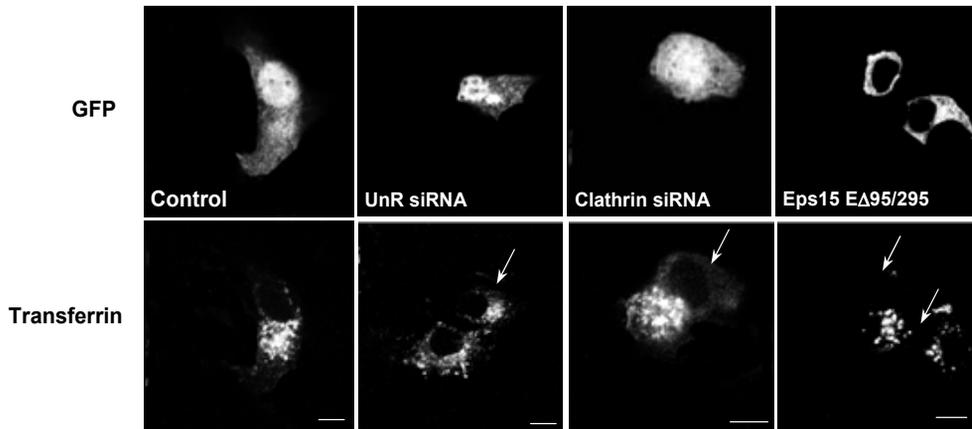
Supplementary Figure S2. Ceridono et al.



Supplementary Figure S3. siRNA-mediated clathrin knockdown.

Chromaffin cells were transfected with an empty pEGFP-RNAi vector (control) or with plasmid coding for an unrelated siRNA (UnR) or for clathrin siRNA. After 48 h, cells were fixed and processed for immunofluorescence with the anti-clathrin heavy chain antibody and analyzed by confocal microscopy. Anti-clathrin staining was revealed with Alexa-555-conjugated anti-mouse antibodies. Transfected cells are indicated with an arrow. Bar: 5 μ m. The histogram shows a semi-quantitative analysis of the clathrin content in non-transfected cells (NT) or in cells expressing the indicated siRNA. Data are given as the mean values \pm S.E.M. (n=25 cells).

Supplementary Figure S3. Ceridono et al.



Supplementary Figure S4. Effect of clathrin siRNA and Eps15 E Δ 95/295 on transferrin internalization in chromaffin cells.

Chromaffin cells expressing GFP (control), an unrelated siRNA, a clathrin siRNA or the dominant negative GFP-Eps15_{E Δ 95/295} were serum-starved for 3 h and then incubated for 30 min at 37°C in the presence of Alexa-555-conjugated transferrin. Cells were fixed, processed for immunofluorescence and analyzed by confocal microscopy. Transfected cells are indicated with an arrow. Bar: 5 μ m. The histogram represents a semi-quantitative analysis of transferrin uptake based on the fluorescence intensity in non-transfected (NT), or cells expressing the indicated constructs. Data are given as the mean values \pm S.E.M. (n= 25 cells).

Method for transferrin internalization assay.

Chromaffin cells were serum-starved for 3 h at 37°C and subsequently incubated for 30 min at 37°C in DMEM containing 0.1 mg/ml Alexafluor 555-conjugated transferrin. Cells were then fixed and analysed by confocal microscopy.

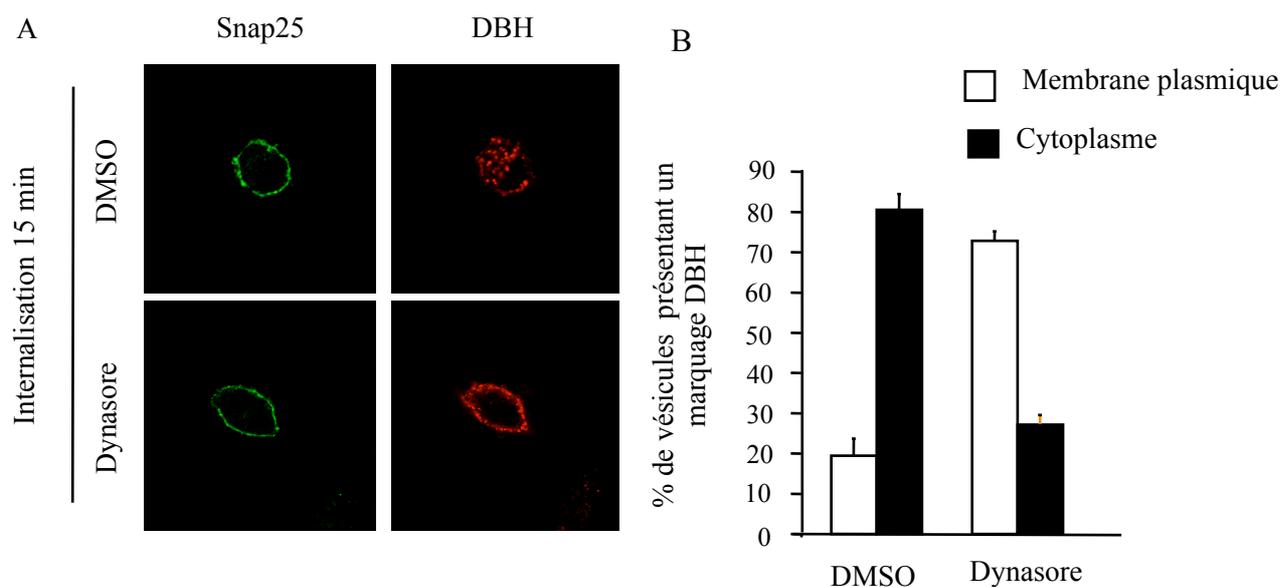


Figure 45 : Effet du dynasore sur l'internalisation de DBH dans les cellules chromaffines. Les cellules sont préalablement traitées avec 80 μ M de dynasore. Après stimulation des cellules, un test d'internalisation avec un anticorps polyclonal de lapin anti-DBH est effectué pendant 15 minutes (cf. matériel et méthode). A Acquisition d'image en microscopie confocale après fixation des cellules et marquage avec un anticorps secondaire anti-lapin. B- Détermination de la proportion de vésicules internalisées (DBH positives) par la méthode de quantification par carte de distance Euclidienne (cf. matériel et méthode).

IV-Résultats complémentaires : implication de la dynamine 2 dans l'internalisation des membranes de granules après exocytose.

La mise au point du test d'internalisation nous permet d'aller un peu plus loin dans la caractérisation des mécanismes moléculaires mis en jeu au cours de l'endocytose compensatrice. Grâce au suivi de l'internalisation de la DBH, nous avons pu confirmer l'implication de la clathrine. Les travaux du groupe de C. Artalejo ont suggéré une implication de la dynamine au cours de l'endocytose compensatrice dans les cellules chromaffines après une exocytose de type « Full Collapse » (Artalejo et al., 2002b ; Elhamdani et al., 2006b).

Les isoformes 1 et 2 de la dynamine sont exprimées dans les cellules chromaffines. Cependant, l'isoforme 2 est exprimée de façon plus abondante que l'isoforme 1 (Artalejo et al., 2002b ; nos résultats non publiés). Les travaux de Galas et collaborateurs, effectués au laboratoire, montrent la présence de la dynamine 2 à la membrane des granules de sécrétion (Galas et al., 2000).

Afin de confirmer son implication au cours de l'endocytose compensatrice, j'ai tout d'abord utilisé le dynasore (Macia et al., 2006) composé qui inhibe l'activité GTPasique des dynamines sans changer l'affinité pour le GTP. Il est réversible et ne semble pas interférer avec l'activité GTPasique d'autres GTPases. L'incubation des cellules chromaffines 10 minutes dans un milieu Locke contenant 80 μ M de dynasore (cf. matériels et méthodes) entraîne une inhibition d'environ 65% de l'endocytose (**Figure 45**). Ce résultat confirme l'implication de la dynamine sans toutefois renseigner sur l'isoforme impliquée.

Afin de discriminer l'implication de l'une ou l'autre de ces isoformes, j'ai utilisé les mutants dynamine 1^{K44A} ou dynamine 2^{K44A}. Ces mutants présentent une affinité réduite pour le GTP et sont connus pour inhiber les voies d'endocytose dépendantes de la dynamine (Damke et al., 2001b). Après transfection des cellules chromaffines, une inhibition de l'internalisation de DBH est observée seulement lorsque les cellules expriment le mutant dynamine 2^{K44A}. En effet, seulement 12% des vésicules positives pour la DBH sont internalisées dans le cytoplasme des cellules transfectedes avec ce mutant, contre environ 60 % dans les cellules contrôles (transfectedes par la GFP) (**Figure 46**).

Notons que le traitement des cellules chromaffines par le dynasore ou leur transfection par des plasmides codants pour les mutants K44A des dynamines, ne semblent pas modifier

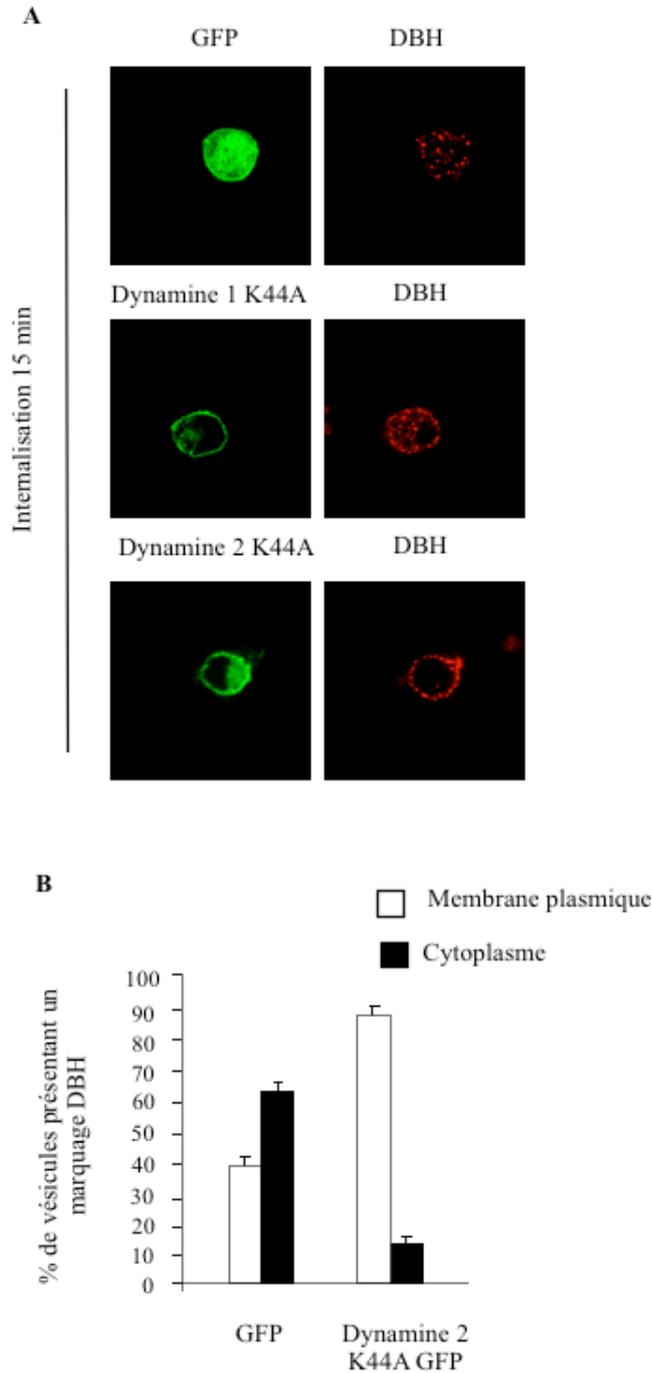


Figure 46 : Effet des mutants Dynamine 1K44A et Dynamin 2K44A sur l'internalisation de DBH dans les cellules chromaffines. Les cellules sont transfectées soit avec le vecteur GFP, soit avec le plasmide codant pour les séquences dynamine 1K44A-HA ou dynamine 2K44A-GFP. Après lavage et stimulation des cellules, un test d'internalisation avec un anticorps polyclonal de lapin anti-DBH est effectué pendant 15 minutes (cf. matériel et méthode). A- Acquisition d'images en microscopie confocale après fixation des cellules et marquage avec un anticorps secondaire anti-lapin. B- Détermination de la proportion de vésicules internalisées (DBH positives) par la méthode de quantification par carte de distance Euclidienne (cf. matériel et méthode).

l'activité sécrétrice des cellules. En effet, nous observons dans ces conditions que la quantité de DBH externalisée à la surface pendant l'exocytose n'est pas modifiée (résultats non montrés). De plus, nous avons précédemment montré au laboratoire que ces mutants dynamines ne modifiaient pas la sécrétion de GH dans les cellules PC12 (Malacombe et al., 2006b). Les résultats observés ne sont pas liés à une diminution de l'exocytose mais bien à une inhibition de l'internalisation de la DBH. Ces résultats confirment l'implication de la dynamine 2, et non de la dynamine 1, au cours du processus d'endocytose compensatrice mesurée dans nos conditions expérimentales.

V- Discussion

L'ensemble de ces résultats a permis des avancées importantes dans la compréhension des mécanismes régissant l'endocytose compensatrice. Tout d'abord la mise au point des mesures d'internalisation des anticorps anti-DBH nous a permis de disposer d'un test spécifique d'endocytose compensatrice des composants granulaires. Ce test a été effectivement validé puisque nous confirmons l'implication de la clathrine et de la dynamine 2 au cours de l'endocytose compensatrice faisant suite à une exocytose de type « Full Collapse ». Le second aspect de notre étude, plus novateur, montre le rôle primordial de la scramblase 1 dans l'externalisation de phosphatidylsérine au cours de l'endocytose (**Figure 47**). Ce résultat souligne l'importance et la nécessité d'une réorganisation de la distribution des phospholipides au cours de l'endocytose compensatrice. Cependant certaines zones d'ombres persistent et au cours de cette discussion, j'aimerais aborder quelques points plus particulièrement intéressants.

A- Importance des dynamines

Nos résultats confirment l'implication de la dynamine 2 au cours de l'endocytose compensatrice. Une critique que l'on peut faire sur ces données porte sur la localisation des protéines surexprimées. La dynamine 2 endogène est présente sur les granules de sécrétion, or les mutants dynamine 2_{K44A} sont localisés à la membrane plasmique et dans le cytoplasme (**Figure 46**). Afin de confirmer les résultats obtenus et de se prémunir de tout effet aspécifique dû à cette mauvaise localisation, des expériences utilisant des RNA interférents dirigés contre la dynamine 2 sont actuellement en cours d'expérimentation.

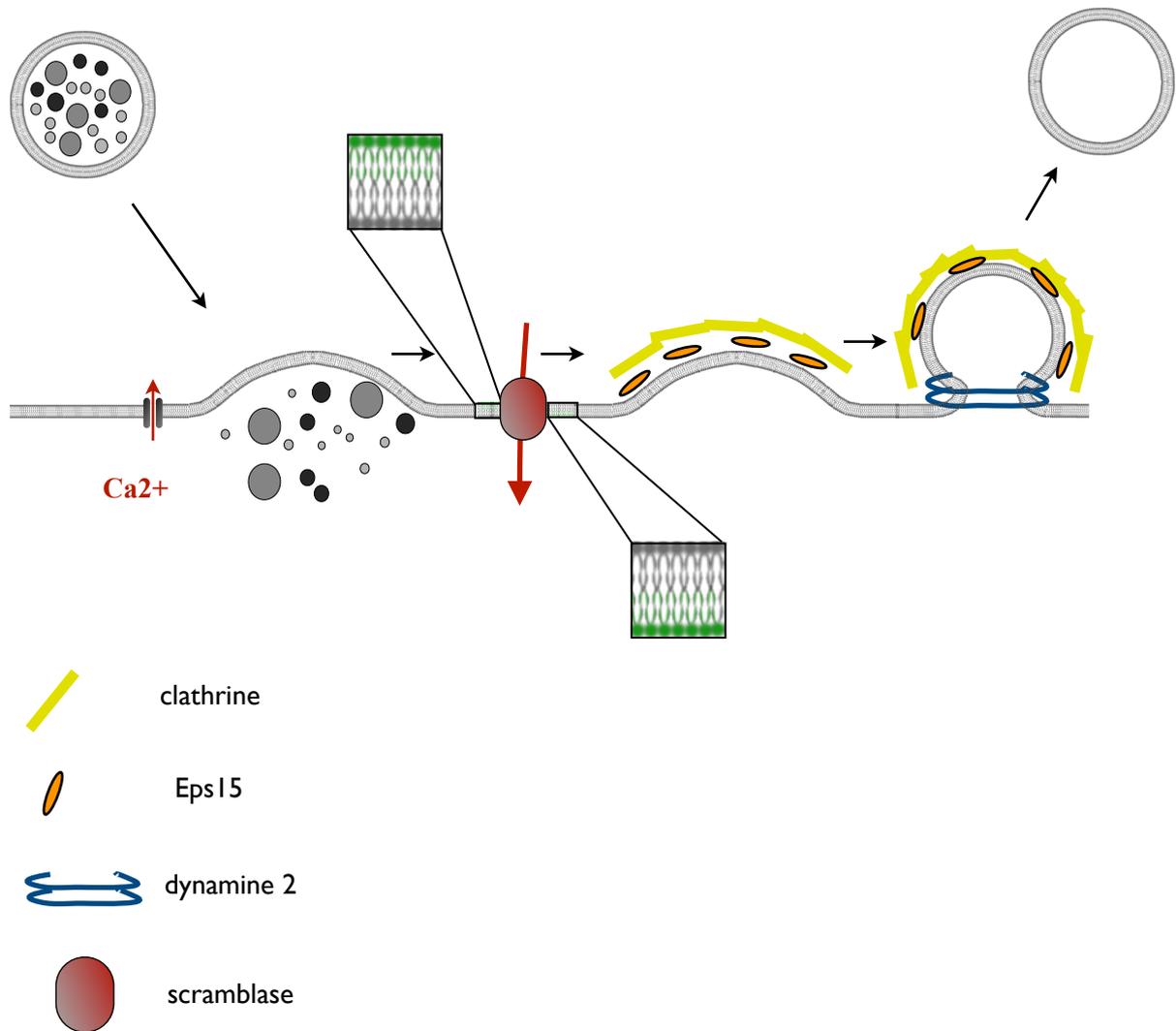


Figure 47: Schéma général regroupant l'ensemble des données obtenues au cours de la publication 2. Après exocytose, l'activité de la scramblase est stimulée et permet une translocation de PS vers le feuillet externe de la membrane plasmique. Les protéines Eps15, clathrine et dynamine 2 sont recrutées pour assurer l'endocytose de composés de la membrane du granule.

Nos résultats et l'ensemble des données de la littérature laissent à penser que les deux isoformes de dynamine pourraient avoir un rôle différentiel en fonction du mode d'exo-endocytose. Malheureusement, notre méthode de mesure ne nous permet pas d'accéder aux événements de recapture plus rapides comme ceux observés suite à une exocytose de type « Kiss and Run ». Afin de pallier cela, nous pourrions utiliser la technique de mesure de sécrétion par ampérométrie à fibre de carbone. Cette technique est utilisée pour caractériser l'activité d'une cellule sécrétrice libérant des substances oxydables (catécholamines ou indolamines) et permet d'accéder à des paramètres tels que la dilatation et le temps d'ouverture du pore de fusion ainsi que la quantité de catécholamines libérées (**Figure 48**). Cette technique a l'avantage de posséder une bonne résolution cinétique et permet de renseigner sur le type d'exocytose effectuée par la cellule. En combinant nos outils moléculaires et l'utilisation de cette approche, nous allons pouvoir vérifier l'importance des deux isoformes de la dynamine au cours de différents types d'exocytose. De plus, il serait important de vérifier de façon plus précise que ces deux isoformes n'altèrent pas l'exocytose des cellules comme cela a été suggéré au cours d'études réalisées dans des cellules β -pancréatiques (Min et al., 2007).

Une dernière question reste posée, quelles divergences existe-t-il entre les deux isoformes pour expliquer leur implication respective dans deux mécanismes d'exo-endocytose différents ? Un aspect de la régulation de l'activité des deux dynamines m'a interpellé. Le groupe de T. Sudhof montre que seule la dynamine 1 est phosphorylable par la PKC (Sontag et al., 1994). Une phosphorylation de la PKC sur la Dynamine 1 semble avoir deux effets : inhiber sa liaison aux lipides (Powell et al., 2000) et augmenter sa liaison au calcium. Cependant, l'activité GTPasique de la dynamine 1 phosphorylée après liaison au calcium est inhibée alors que sous forme déphosphorylée, la liaison au calcium augmente son activité *in vitro* (Liu et al., 1996). Si l'on fait un corolaire avec les travaux du groupe de C. Smith qui suggèrent l'activation et l'implication de la PKC comme modulateur du mode de fusion, on peut imaginer un modèle dans lequel, la dynamine 1 serait recrutée au niveau des sites d'exocytose seulement dans des conditions de stimulation faible. Après une stimulation plus importante, une augmentation de calcium activerait la PKC qui phosphorylerait la dynamine 1 empêchant ainsi une localisation et/ou une activation aux sites d'exocytose. Cette hypothèse pourrait être testée en étudiant l'effet du mutant dynamine 1 S795A non phosphorylable par la PKC sur la recapture des granules de sécrétion.

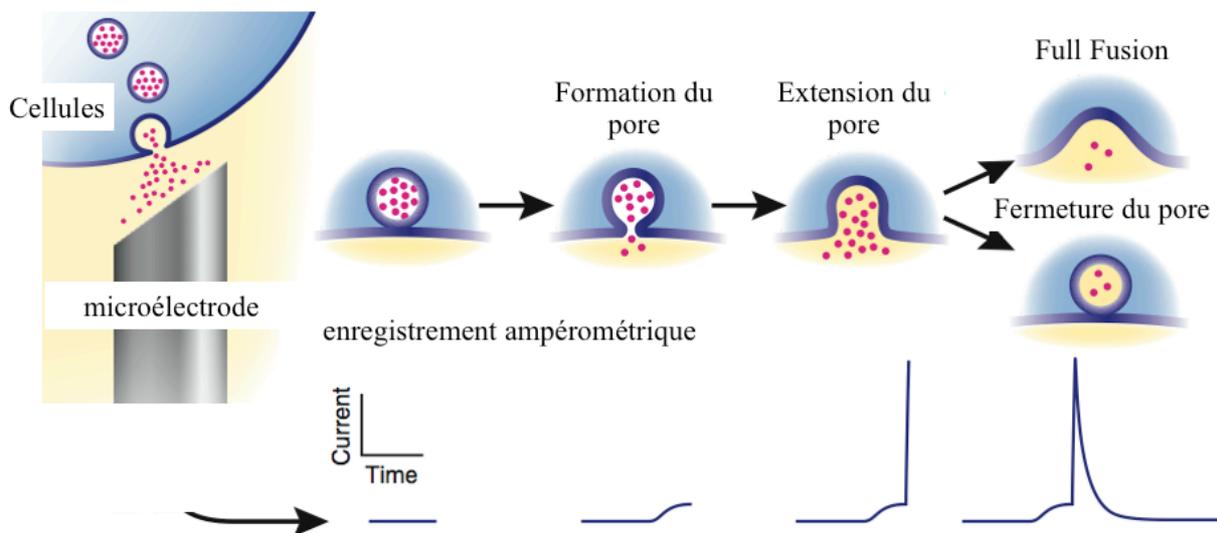


Figure 48 : Principe de la technique d'ampérométrie. Une électrode en fibre de carbone de petit diamètre (entre 5 et 10 μm) est amenée à proximité de la cellule à étudier, un potentiel constant (supérieur au potentiel d'oxydation des substances oxydables) est appliqué entre l'électrode et une électrode de référence située dans le milieu ; les catécholamines ou indolamines libérées suite à la stimulation de l'exocytose vont être oxydées par le potentiel appliqué, ce qui va libérer des électrons et induire un signal (Mosharov and Sulzer 2005). L'expérimentateur a accès aux différents paramètres cinétiques de la sécrétion des catécholamines (ou indolamine) libérées. L'analyse des enregistrements ampérométriques aboutit à l'obtention de paramètres tels que le degré de dilatation et le temps d'ouverture du pore de fusion, et la quantité de catécholamines libérées.

B- Un couplage spatial de l'exo-endocytose ?

Avant de poser la question d'un couplage spatial entre l'exocytose et l'endocytose, il est nécessaire de s'interroger sur la spécificité des éléments internalisés. Autrement dit, l'endocytose observée est-elle sélective des composants du granule ?

Au cours de notre étude, nous observons qu'après 10 minutes d'internalisation, la majorité des anticorps anti-DBH sont internalisés. Il n'en reste quasiment plus à la membrane plasmique après 30 minutes d'internalisation. De plus, si nous réalisons un co-marquage de la DBH internalisée avec une autre protéine granulaire tel que VMAT2 ou la phogrine, nous observons une co-localisation démontrant que les éléments constituant le granule de sécrétion sont internalisés ensemble. De plus, nous avons effectué des expériences d'internalisation d'anticorps anti-DBH dans les cellules chromaffines dont la membrane plasmique a été préalablement marquée avec de la biotine fluorescente (non montré) ou avec une protéine ancre-GPI couplée à la GFP (publication 2, figure 3). Dans les deux cas, nous n'observons aucune colocalisation entre la DBH internalisée et la fluorescence provenant de la biotine ou de la GPI. Ces observations démontrent que les composants granulaires sont recapturés *via* des vésicules exempts de membrane plasmique. Autrement dit l'intégrité de la membrane granulaire, transitoirement insérée dans la membrane plasmique au cours de l'exocytose, serait préservée en vue de sa recapture ultérieure. A l'inverse, une autre étude utilisant également la microscopie à fluorescence suggère que dans les cellules chromaffines, les membranes internalisées après endocytose contiennent également des éléments de la membrane plasmique (Fulop et al., 2005). Les auteurs proposent une endocytose de type « endocytose de phase fluide », sans spécificité des membranes ni des composés internalisés. Cependant ces résultats restent peu convaincants. En effet, au cours de leurs expériences, les auteurs utilisent des marqueurs se liant aux membranes de façon aspécifique (concanaline A) et observent une augmentation de la fluorescence intracellulaire après stimulation des cellules. Or cette fluorescence apparaît diffuse et aucune expérience de marquage granulaire n'est effectuée pour contrôler que cette endocytose est bien relative à une endocytose des éléments du granule de sécrétion (Fulop et al., 2005). De plus, conceptuellement, ce type d'endocytose me paraît plus complexe à réaliser pour la cellule car une étape de tri supplémentaire devra être effectuée afin de discriminer les composés de la membrane plasmique de ceux du granule de sécrétion. Au contraire, j'imagine un modèle plus « économique » dans lequel la membrane du granule et ses composés ne diffuseraient pas dans la membrane plasmique et seraient recapturés intacts.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous allons continuer notre collaboration avec l'équipe de Yannick Bailly pour des expériences de microscopie électronique. Nous pourrions ainsi déterminer de façon précise, au niveau ultra-structurel, si les vésicules transportant les composés granulaires sont bel et bien dépourvues de membrane plasmique.

Qu'en est-il maintenant du couplage spatial a proprement parlé ? Une fois le granule fusionné avec la membrane plasmique, je propose deux hypothèses : 1) la recapture de la membrane granulaire s'opère au même endroit que la fusion, dans ce cas, l'exocytose et l'endocytose sont strictement couplées de façon spatiale, 2) le granule préserve son identité au sein de la membrane plasmique mais il diffuse entier jusqu'à atteindre des sites potentiels d'endocytose pour être recapturés, le couplage n'est alors plus spatial. Une variante de ce dernier type d'endocytose serait que la fusion au niveau d'un site d'exocytose déclencherait la recapture d'un autre granule en attente au niveau des sites d'endocytose. Cette notion a été notamment suggérée dans les neurones sous le terme de « Readily Retrievable Vesicles » (Rizzoli and Jahn, 2007).

Nos résultats et notre approche méthodologique ne nous permettent pas de répondre à cette question. En revanche, l'utilisation de la microscopie TIRFM pourrait être bien utile. Aussi, une expérience de TIRFM sur des cellules chromaffines co-exprimant une protéine transmembranaire du granule (DBH, phogrin, VMAT2) ainsi qu'un marqueur d'endocytose (dynamine ou clathrine) nous indiquerait si nous avons à faire à un couplage spatial de l'exo-endocytose.

C- Un facteur à l'origine du couplage exo-endocytose ?

L'idée du couplage entre l'exocytose et l'endocytose laisse à penser qu'il existe une ou plusieurs protéines bi-fonctionnelles qui participeraient de façons séquentielles à l'exocytose et à l'endocytose. En effet, de tels acteurs protéiques permettraient une économie de temps et d'énergie pour la cellule. De plus, dans un environnement déjà fortement encombré par la multitude de protéines impliquées au cours de l'exocytose, des facteurs jouant ce double jeu pourrait être favorable à la cellule en termes d'encombrement spatial. Dans cette optique, deux candidats potentiels m'apparaissent particulièrement adaptés pour ce couplage : la synaptotagmine et l'intersectine.

La synaptotagmine, nous l'avons vu précédemment, joue un rôle important dans l'exocytose régulée. Cependant, elle a également été impliquée au cours de l'endocytose

dépendant de la clathrine dans des fibroblastes (von Poser et al., 2000) et au cours du recyclage des vésicules synaptiques dans *C. Elegans* (Jorgensen et al., 1995). De plus, elle est capable de lier le complexe de protéine adaptatrice AP-2. Dans le cas où l'endocytose compensatrice des cellules endocrines nécessite le recrutement de facteurs tels que AP-2 (ce qui reste à démontrer), l'utilisation de mutants de la synaptotagmine (K326,327A) ne liant plus ce facteur, nous renseignerait sur l'importance de cette association au cours de l'endocytose compensatrice.

Dans ce rôle, l'intersectine 1 apparaît également comme un bon candidat. Cette protéine initialement identifiée comme impliqué dans l'endocytose dépendante de la clathrine (Hussain et al., 2001), a été mise en évidence au cours de l'exocytose régulée dans les cellules PC12 dans notre équipe (cf. page 49) (Malacombe et al., 2006b). L'intersectine 1 semble interagir avec la dynamine et permettre son recrutement au cours de l'endocytose des vésicules synaptiques (Okamoto et al., 1999 ; Rose et al., 2007). Dans ce contexte, l'intersectine 1 paraît être un bon candidat pour réguler le couplage entre l'exocytose et de l'endocytose. Une approche par immunoprécipitation permettrait tout d'abord de déterminer si une interaction entre la dynamine 2 et l'intersectine 1 a lieu dans nos cellules après une stimulation de l'exocytose de type « Full Collapse ». L'interaction de la Dynamine 2 se fait par le domaine SH3 de l'intersectine. Si cette interaction a bien lieu dans notre système, il serait important de déterminer précisément les acides aminés impliqués. En effet les domaines SH3 sont responsables de différentes interactions et la surexpression d'un mutant intersectine 1 ne possédant plus ce domaine pourrait inhiber l'exocytose ou l'endocytose compensatrice indépendamment de la liaison avec la Dynamine. Des mutations ponctuelles aux sites d'interactions de la dynamine seraient plus judicieuses. Nous pourrions alors réaliser des tests d'internalisation de la DBH avec ces mutants afin de déterminer l'importance de cette interaction.

D- Quel devenir pour le granule ?

Cette question demeure toujours en suspens et aucune étude actuellement n'a permis d'y répondre de façon précise. D'anciens travaux utilisant la microscopie électronique suggèrent un recyclage des composants du granule. En effet, une fois internalisés, une partie de ces composants est retrouvée au niveau de nouveaux granules de sécrétion, suggérant ainsi un recyclage de ces éléments (Patzak and Winkler, 1986). Vers quels compartiments cellulaires vont transiter ces composants ?

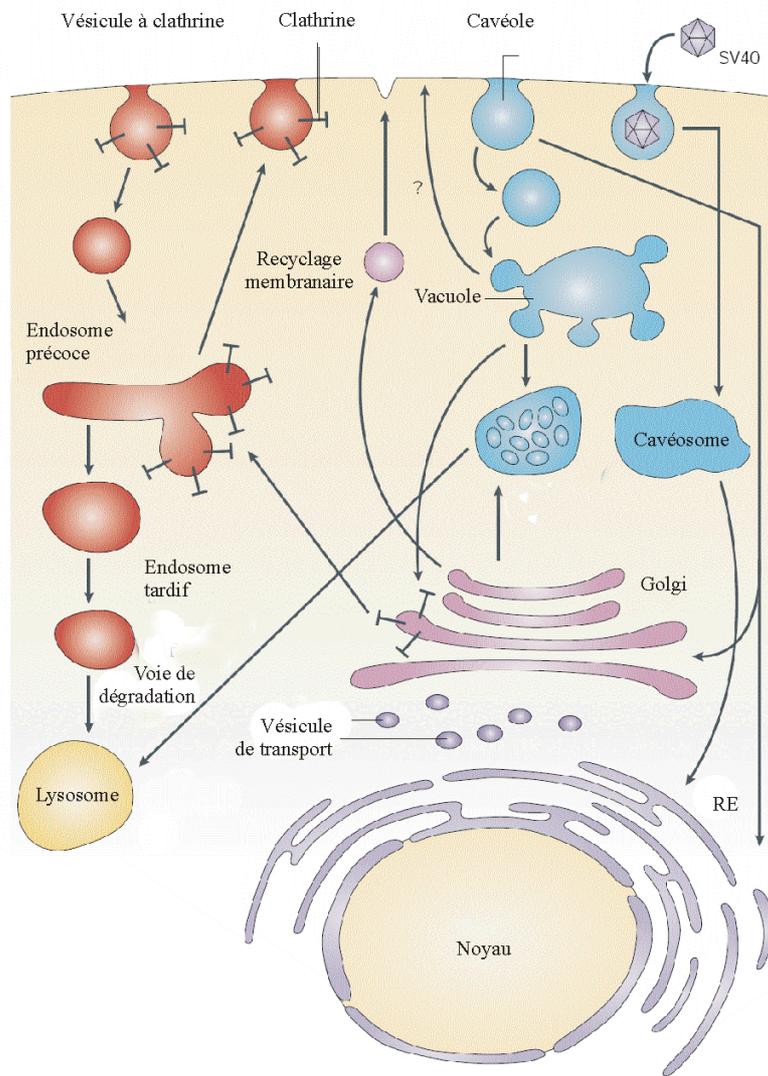


Figure 49: Représentation schématique des principaux compartiments intracellulaires. D'après Carver 2003

C'est dans ce type de question que l'utilisation de notre test d'internalisation de la DBH peut s'avérer précieux. Afin de déterminer le devenir des composants du granule, il serait intéressant d'effectuer des tests d'internalisation de la DBH en des co-marquages des principaux compartiments intracellulaires connus. Par exemple nous pourrions utiliser des anticorps dirigés contre les protéines EEA1 pour marquer les endosomes précoces, Lamp1 pour les endosomes tardifs, CathepsinD pour les lysosomes et TGN38 pour l'appareil de Golgi (**Figure 49**).

Enfin, l'utilisation de la microscopie électronique pourrait nous renseigner à l'échelle ultra-structurale sur la morphologie des granules internalisés. Nous pourrions ainsi déterminer avec précision, la taille de ces vésicules, la distribution et la fusion éventuelle avec d'autres organelles à différents temps d'internalisation.

E- Rôle de la translocation du phosphatidylsérine

Au cours de ces travaux, nous avons pu souligner l'importance de la translocation de phosphatidylsérine au cours de l'endocytose compensatrice. En effet, en inhibant cette translocation nous observons une inhibition drastique de l'endocytose. Cependant, le rôle exact de cette translocation reste inconnu.

Une des hypothèses que nous avançons dans la discussion de l'article repose sur la capacité du phosphatidylsérine à lier la synaptotagmine I sur ces domaines C2A et C2B. Nous l'avons vu précédemment, ce domaine de liaison permet également la liaison à des protéines impliquées au cours de l'endocytose. Ainsi, la translocation du PS par la scramblase induirait une libération des domaines C2A et C2B qui pourraient alors recruter la machinerie de l'endocytose.

Les phospholipides et notamment le phosphatidylsérine présentent des têtes polaires chargées négativement (cf. page 31), de ce fait ils peuvent attirer des protéines contenant des motifs polybasiques (Yeung et al., 2008). Ainsi, la translocation de PS pourrait être un signal pour délocaliser les protéines recrutées à la membrane en diminuant les charges électrostatiques. La translocation pourrait avoir lieu en fin d'endocytose afin de libérer toute la machinerie d'exo-endocytose. Cette hypothèse paraît attrayante, cependant elle ne coïncide pas réellement avec nos résultats. En effet, lorsque la translocation de PS est inhibée, nous observons un défaut de recrutement de la clathrine. Ceci suggère que cette translocation se déroule dans des étapes d'endocytose précédant l'intervention de la clathrine.

Enfin, le PS est un des nombreux composants des radeaux lipidiques. Ces « rafts » semblent être impliqués à la fois dans des mécanismes d'exocytose et d'endocytose (cf. page 32) Dans l'hypothèse où les rafts auraient un rôle dans l'exocytose des granules de sécrétion, pourrions-nous imaginer que la translocation du PS vers la face externe de la membrane plasmique serait en réalité un signal de déstabilisation des rafts afin de permettre une endocytose de type dépendante de la clathrine ? Il est à noter que l'annexine 2, qui pourrait être à l'origine de la formation et de la stabilisation des rafts (Chasserot-Golaz et al., 2005), est capable de lier le PS. La rupture d'une telle liaison pourrait destabiliser l'annexine 2 qui ne pourrait plus assurer le maintien des radeaux lipidiques. Même si la scramblase effectue une translocation active du PS, on peut se demander si elle possède l'énergie nécessaire pour la translocation alors que le PS est lié à toutes ces protéines. On peut alors imaginer le scénario inverse où ce serait le départ de l'annexine 2 qui permettrait à la scramblase de réaliser une translocation du PS, ainsi les domaines de la synaptotagmine pourraient être libérés pour recruter les partenaires de la voie d'endocytose. L'une et l'autre des ces hypothèses sont possibles, tout dépend en fait de la force des interactions de chaque protéine mise en jeu.

F- La Scramblase

Enfin j'aimerais revenir sur la protéine scramblase. L'étude réalisée ici met en évidence l'importance de cette protéine. Dans ce contexte, son activité est dépendante du calcium car l'utilisation du mutant PLSCR1^{D284A} insensible au calcium inhibe la translocation. Même si la surexpression de la protéine PLSCR1 sauvage ne modifie ni l'exocytose ni l'endocytose, on ne peut exclure la possibilité d'un effet aspécifique dû à la surexpression du mutant. C'est pour cela que nous dirigeons nos prochaines études vers la construction de si RNA dirigée contre la scramblase.

Une information importante manque à notre étude, celle de la localisation de la protéine. Par RT-PCR, nous avons pu mettre en évidence la présence de l'ARNm de la PLSCR1 dans les cellules chromaffines (non montré), mais faute d'anticorps spécifiques, nous n'avons pas réussi à la localiser par expérience d'immunofluorescence.

VI-Conclusion

Ces résultats montrent, pour la première fois, que la réorganisation de la distribution des phospholipides des bicouches au cours du processus de sécrétion requiert l'intervention de la scramblase 1 mais n'est pas impliqué au cours de l'exocytose des granules *per se* mais au cours de l'endocytose compensatrice qui lui fait suite. Beaucoup de question concernant la régulation des mécanismes moléculaires du couplage exo-endocytose sont encore d'actualité. A l'avenir, la combinaison de différentes approches pourrait permettre d'y voir un peu plus clair. Nous l'avons vu au cours de l'introduction, le mode d'endocytose dépendant de la clathrine fait intervenir différents acteurs. A l'heure actuelle, nous avons mis en évidence la présence de trois d'entre eux : la clathrine, la dynamine 2 et Eps15. Au cours de cette endocytose après « Full Collapse », une machinerie importante semble se mettre en place. Ceci apparaît assez cohérent avec le mode de fusion du granule. En effet, la vésicule ayant réalisé une exocytose de ce type a perdu sa structure et des acteurs protéiques importants doivent être mis en œuvre pour assurer une endocytose compensatrice. Il reste cependant à démontrer quels sont les autres acteurs impliqués. Certains, et notamment le groupe d'Artalejo, comparent cette endocytose à une endocytose de « récepteur » (Elhamdani et al., 2006b). Etant donné la diversité des voies d'endocytose dépendant de la clathrine, (cf. page 28), les choses ne sont pas si simples que cela et il serait maintenant judicieux de définir les différents acteurs impliqués. L'utilisation de mutants et de ARNi dirigés contre des facteurs ayant été impliqués au cours d'endocytose dépendante de la clathrine permettrait de définir plus clairement les partenaires impliqués.

Discussion générale

Nous avons démontré dans un premier temps, l'importance de la GTPase Rac1 au cours du processus d'exocytose régulée. Pour la première fois, nous mettons en évidence le rôle de cette protéine au cours des phases tardives de l'exocytose par une régulation de la formation de phospholipides au niveau de la membrane plasmique. Nous avons également démontré l'importance de la protéine scramblase au cours du processus d'endocytose. Là encore, cette protéine participe à la dynamique des lipides en induisant une translocation de PS nécessaire à l'endocytose compensatrice. Ces travaux soulignent l'importance primordiale de la régulation de la dynamique des phospholipides dans les mécanismes d'exo-endocytose des cellules chromaffines.

Au cours de cette discussion générale, j'aimerais aborder différents points au sujet de l'étude en elle-même, ainsi que certains aspects dans un contexte plus général d'exo-endocytose. Je consacrerai un premier paragraphe à l'analyse critique de la méthodologie que nous avons employée, en faisant ressortir ses avantages et ses limites. Ensuite, je poserai la question de l'implication possible de Rac1 au cours du mécanisme d'endocytose compensatrice. Au cours de nos travaux, nous nous sommes placés dans des conditions expérimentales nous permettant d'étudier spécifiquement des mécanismes d'exo-endocytose des cellules chromaffines suite à une exocytose de type « Full Fusion ». Il semble donc intéressant de se questionner quant à la « validité » de ces résultats au cours d'événements d'exo-endocytose après un événement de « Kiss and Run ». Enfin, avec toujours à l'esprit la possibilité d'extrapoler nos résultats, j'aborderai l'épineuse question de la comparaison entre les cellules chromaffines et les cellules neuronales avec cette interrogation : Rac1 et la scramblase ont-elles un rôle à jouer dans la régulation de l'exo-endocytose dans les cellules neuronales ?

I- Critique de l'approche méthodologique

A- Mode de stimulation

Dans la glande surrénale, les cellules chromaffines sont stimulées via les récepteurs muscariniques/nicotiniques. Au cours de nos travaux, nous avons principalement stimulé nos

cellules avec une solution physiologique de Locke (voir composition en matériels et méthodes) présentant une concentration de potassium élevée (K^+ 59 mM). Ce type de stimulation est classiquement utilisé pour déclencher une exocytose massive dans de nombreuses cellules sécrétrices. La forte concentration d'ions potassium provoque une dépolarisation membranaire aboutissant à une entrée d'ions calcium. D'après une étude réalisée par le groupe de Corey Smith, une stimulation de 30 mM de potassium induirait une augmentation de calcium intracellulaire équivalente à une stimulation électrique de 15 Hz. En termes physiologiques, ceci équivaut à une stimulation induite en cas de « stress aigu » (Fulop and Smith, 2007). En stimulant les cellules avec une solution de potassium à 59 mM, nous nous plaçons donc dans des conditions de stimulation « supra-physiologiques ». Une stimulation trop importante des cellules ne pose pas de problème en ce qui concerne l'étude du mécanisme moléculaire de l'exocytose (à condition bien sûr de rester dans des conditions de stimulation qui n'altèrent pas l'intégrité cellulaire). A partir d'un certain seuil de stimulation, les granules accostés ou arrimés à la membrane plasmique vont fusionner avec celle-ci et les granules du pool de réserve vont être recrutés et amenés au site d'exocytose avec les mêmes acteurs protéiques et lipidiques quelle que soit l'importance de la stimulation. En revanche, le mode d'exocytose et le mode d'endocytose compensatrice sont dépendants de l'intensité de la stimulation (cf. page 20). Avec ces conditions de stimulation, nous nous plaçons dans une situation favorisant les événements d'exocytose de type « Full Collapse ». Si l'on voulait étudier des processus de type exo-endocytose après « Kiss and Run », il faudrait alors stimuler nos cellules avec des solutions contenant des concentrations de potassium moins élevées.

B- Durée de la stimulation

La stimulation de l'exocytose est réalisée pendant une période de 10 mn ce qui dépasse largement la vitesse de réponse à l'exocytose dans notre modèles cellulaire. Cependant, cette stimulation prolongée est nécessaire pour des expériences de biochimie qui se font sur des millions de cellules. Les cellules n'étant pas synchronisées, ceci peut poser un problème de détection de l'activité enzymatique. Prenons l'exemple du dosage d'activité de la GTPase Rac1. Après 5 min de stimulation, la proportion de Rac1 activée devient significative et le maximum de détection est atteint après 10 min de stimulation (cf. Publication 1, Figure 1) Cet effet observé ne reflète probablement pas une réelle cinétique de l'activation d'une molécule Rac1 au cours de l'exocytose mais plutôt un effet d'activation de « masse », dans un

maximum de cellules. Ceci est en corrélation avec les résultats de dosage de l'activité de la phospholipase D qui présente elle aussi un maximum d'activité après 10 minutes de stimulation (cf. Publication 1, Figure S2). Quant à la sécrétion de GH, elle atteint également un maximum entre 5 et 10 minutes de stimulation (cf. Publication 1, Figure 1). Nous nous plaçons donc dans des conditions où l'activité sécrétrice des cellules est encore importante. Le test d'internalisation de la DBH confirme ces données car après 10 minutes de stimulation les granules de sécrétion fusionnent toujours avec la membrane plasmique. Par souci d'homogénéité des résultats, nous avons ensuite réalisé les expériences d'immunofluorescence avec le même temps de stimulation.

C- Mesure de l'exo-endocytose

1- Mesure de l'activité sécrétrice par le test de sécrétion de hGH

La mesure de sécrétion de GH n'apporte pas de réponse en terme de cinétique de l'exo-endocytose, ni ne renseigne sur les étapes de ce processus. En revanche, elle permet d'obtenir des informations quantitatives de l'exocytose sur des milliers de cellules. Les cellules PC12 n'exprimant pas naturellement d'hormone de croissance, l'utilisation d'un plasmide bi-cistronique codant à la fois pour cette hormone et pour un ARNi nous permet de suivre directement l'effet du blocage de l'expression de notre protéine d'intérêt sur l'exocytose sans nous préoccuper du taux de transfection.

2- Qu'étudions-nous dans nos conditions expérimentales ?

Nous l'avons vu au cours du troisième chapitre, le test d'internalisation de DBH analysé par microscopie confocale s'avère très utile quant à la visualisation de l'endocytose compensatrice des composants du granule ainsi qu'à leur devenir. Cependant, ce test de suivie de l'endocytose compensatrice ne permet de visualiser que des évènements d'endocytose ayant lieu après la création d'un pore de fusion suffisamment important pour que l'anticorps anti-DBH puisse accéder à sa cible. Il en est de même pour notre test de sécrétion qui reflète uniquement des évènements d'exocytose où le pore de fusion entre le granule et la membrane plasmique sera suffisamment important pour permettre la libération de hGH dont le poids moléculaire est d'environ 40 kDa. Autrement dit, au cours de ces deux études, nous nous plaçons dans des conditions expérimentales nous permettant d'étudier les évènements d'exo-endocytose après « Full Fusion » et d'exclure ceux ayant lieu au cours de « Kiss and Run ».

Quant aux autres types d'exo-endocytose intermédiaire tels que la cavapture, cela devient complexe à déterminer. En effet, au cours de leurs travaux, Perrais et collaborateurs, observent une libération de NPY-GFP (protéine entre 34 et 42 Kda, variable selon le degré de clivage du NPY) dans ces conditions de cavapture (Perrais et al., 2004). Il est donc probable que la libération de hGH soit détectable dans ces conditions. En revanche, il faudrait certainement utiliser le fragment Fab des anticorps anti-DBH afin d'adapter le test d'internalisation DBH aux événements de cavapture.

II- Rac1 et l'endocytose compensatrice ?

Rac1, ainsi que la PLD1, ont été impliquées dans des mécanismes d'endocytose dépendants de la clathrine (cf. pages 39 et 47). Si l'on analyse nos résultats, nous observons un maximum d'activation de Rac1 et de la PLD1 après 10 minutes de stimulation. Dans ce temps là, nous ne pouvons pas exclure qu'une partie de la voie Rac1/PLD1 soit dédiée aux mécanismes d'endocytose régulée.

Il serait tentant d'imaginer un scénario dans lequel Rac1 et la PLD1 auraient un rôle à la fois dans l'exocytose et dans l'endocytose compensatrice. Après stimulation de l'exocytose, Rac1 et la PLD1 sont activées et produisent du PA à la membrane plasmique afin notamment de faciliter les courbures de membranes nécessaires à la fusion du granule. Au cours de l'endocytose compensatrice, Rac1 activerait toujours la PLD1, et cette fois, le PA fourni activerait des partenaires comme la PI-5kinase. Cette kinase permettrait la production du PIP2 susceptible entre autre, de recruter la machinerie d'endocytose notamment par sa liaison au complexe AP-2 (cf. page 36). La PLD pourrait également participer à l'accélération de l'activité GTPasique de la dynamine. Il a été montré qu'au cours de l'endocytose du récepteur à l'EGF, le domaine PH de la PLD pourrait agir comme une GAP pour la dynamine (Lee et al., 2006). Indépendamment de la PLD1, Rac1 pourrait participer à la régulation du cytosquelette d'actine. En effet, j'ai abordé au cours de l'introduction, le rôle majeur du cytosquelette d'actine au cours de l'endocytose. A l'heure actuelle, le rôle potentiel du cytosquelette dans l'endocytose compensatrice reste encore à définir. Cependant, une étude récente utilisant la microscopie TIRF montre un recrutement d'actine au site d'endocytose après exocytose dans des cellules PC12 (Felmy, 2008). Ne jouant apparemment pas un rôle dans la régulation du cytosquelette d'actine durant l'exocytose, Rac1 pourrait donc y participer durant l'endocytose compensatrice.

Une autre piste sur le rôle éventuel de Rac1 dans l'endocytose compensatrice des cellules chromaffines serait la régulation de la synaptojanine (cf. page 45). Rac1 pourrait stimuler cette enzyme et participer à la dégradation de PIP2 nécessaire au départ de la machinerie de l'endocytose. L'isoforme synaptojanin 1 a été bien étudiée dans les neurones et cette protéine semble participer à l'endocytose des vésicules synaptiques, toutefois, aucune étude sur la protéine endogène n'a été réalisée dans les cellules chromaffines.

Bien sûr tout cela ne demande qu'à être expérimenté. La difficulté réside dans le fait que si l'on perturbe l'expression ou l'activation de protéines impliquées dans l'exocytose, il est alors difficile d'observer une endocytose compensatrice. L'utilisation d'ARNi dirigées contre les ARNm des protéines Rac1 ou même PLD1 pourrait être envisagée afin d'étudier l'endocytose compensatrice seulement dans le cas où nous pouvons restaurer, même partiellement, l'activité sécrétrice de ces cellules. Encore une fois, une expérience d'ajout de LPC dans le milieu extracellulaire (phospholipide à cône inversé, cf. page 58) pourrait être utile afin de restaurer cette activité. Nous pourrions alors nous intéresser à l'effet de ces RNAi sur l'endocytose compensatrice. Cette expérience reste néanmoins difficile à réaliser. Les mécanismes d'exo-endocytose nécessitent une régulation fine de la composition en lipides et l'ajout de LPC dans le milieu extracellulaire, en créant des courbures de membrane, pourrait perturber à lui seul, l'endocytose compensatrice.

III- Formation de PA, translocation de PS et « Kiss and Run » : quelle compatibilité ?

1- La formation d'acide phosphatidique est-elle nécessaire à une exocytose de type « Kiss and Run » ?

L'un des principaux rôles du PA formé au niveau de la membrane plasmique au cours de l'exocytose des cellules chromaffines est d'induire des courbures négatives afin de favoriser l'étape de la fusion entre le granule et la membrane plasmique. Nous avons vu que différentes hypothèses existent concernant la nature du pore de fusion (cf. page 21). Dans la description du modèle du pore purement protéique, les membranes vésiculaires et plasmiques ne fusionnent pas, le pore est un canal protéique qui permet la sortie des molécules vers le milieu extracellulaire. Si cette configuration existe, elle ne devrait avoir lieu que dans des conditions d'exocytose de type « Kiss and Run » où le pore de fusion resterait relativement

étroit et transitoire, ne nécessitant pas la création de courbures de membranes. Dans ces conditions, il est possible que la formation de PA à la membrane plasmique ne soit pas nécessaire. Cependant, il reste à savoir si ce type de pore est biologiquement compatible dans nos cellules, et si sa structure est suffisamment large pour laisser passer des catécolamines. Afin de répondre à cette question il serait intéressant de déterminer l'effet des ARNi dirigées contre les ARNm des protéines Rac1 et PLD1 sur des événements de « Kiss and Run » évalué par améprométrie et/ou microscopie TIRF.

2- Translocation de phosphatidylsérine dans les cellules chromaffines : un signal pour une endocytose après « Full Collapse » ?

L'une des hypothèses pour expliquer le rôle de la translocation de PS repose sur la capacité de ce phospholipide à lier la synaptotagmine 1 sur ses domaines C2A et C2B. La synaptotagmine 1 régulerait des événements de « Full Fusion » alors que l'isoforme 4 agirait au cours de processus de type « Kiss and Run » (cf. page 21). Une des différences entre ces deux protéines est la capacité à lier le PS. Seule l'isoforme 1 lie le PS. Si la translocation de phosphatidylsérine permet le recrutement de la machinerie d'endocytose *via* la libération des domaines C2A et C2B de la synaptotagmine 1, il est possible que cette translocation n'ait lieu qu'après une exo-endocytose de type « Full Collapse ». On pourrait imaginer que dans le cas d'une exocytose de type « Kiss and Run », la synaptotagmine 1 se lie à la phosphatidylsérine présente sur la face interne de la membrane plasmique. Sans translocation de cette dernière, les sites C2A et C2B de la protéine sont séquestrés et la machinerie de l'endocytose dépendante de la clathrine ne serait alors pas recrutée. L'utilisation de mutant synnatotagmine 1 ne liant plus le PS n'est pas envisageable car cette mutation affecte également sa liaison aux protéines SNARE (Chapman, 2008). Enfin, la scramblase possède une activité relativement lente, 90 secondes pour l'activité la plus rapide enregistrée. Ce dernier élément pourrait également argumenter en faveur d'un rôle de cette protéine dans des événements d'exo-endocytose relativement lents (Sahu et al., 2007). Il serait intéressant de vérifier par des expériences de capacitance, l'effet du mutant scramblase sans activité translocase sur des événements d'exo-endocytose ayant lieu après « Kiss and Run ».

IV-Qu'en est-il dans les neurones?

Au cours de ce manuscrit, j'ai essentiellement abordé l'exo-endocytose dans les cellules chromaffines. Il est toujours intéressant de comparer les résultats obtenus à d'autres modèles et j'ai choisi un des modèles d'exocytose les plus étudié à savoir le neurone.

A- Quel mode d'exo-endocytose dans les neurones ?

Bien évidemment, un paragraphe est loin d'être suffisant pour faire le tour de cette question délicate qui occupe un bon nombre de laboratoires. L'existence ou non du « Kiss and Run » fait toujours débat, et comme c'est souvent le cas en biologie, chacun défend son hypothèse et avance les avantages techniques de ses études. Je vais tout de même tenter de faire un point rapide sur les connaissances actuelles.

Il existe une multitude de types neuronaux différents et d'un point de vue technique, on peut distinguer deux catégories de neurones : les neurones possédant des synapses de grande taille avec lesquels les expériences de capacitances sont possibles (par exemple : synapses en ruban des neurones bipolaires de la rétine, synapse en calyce de Held des neurones du système auditif, neurones de l'hypophyse) et les neurones possédant des synapses de petites tailles (neurones d'hippocampes).

L'exocytose de type « Full Collapse » est généralement bien admise dans tous les types neuronaux grâce aux anciennes expériences de microscopie électronique (Heuser and Reese, 1973). Elle a été confirmée par de nombreuses expériences d'imagerie et d'électrophysiologie (Llobet et al., 2003 ; Gandhi and Stevens, 2003 ; Zhang et al., 2007). Quant à l'endocytose compensatrice, elle ne semble pas être couplée de façon spatiale à l'exocytose, les vésicules qui semblent être fusionnées sont internalisées en dehors des zones actives (Wienisch and Klingauf, 2006). Cette endocytose est dépendante de la clathrine et ferait intervenir des protéines telles que la dynamine, AP-2, la synaptojanin, l'endophiline. Le PI(4,5)P est également impliqué dans ce processus pour revue (Galli and Haucke, 2004). Des études de microscopie électronique suggèrent la présence de larges vésicules qui ressemblent à celles présentes dans le modèle de Heuser *et al* dans la synapse en ruban (Paillart et al., 2003). Dans ce modèle, de larges morceaux de membrane seraient internalisés en même temps par la cellule pour compenser une exocytose massive. Ce mode d'endocytose a été également suggéré suite à des expériences de capacitance mais il ne représenterait qu'environ 10 % des événements d'endocytose (Wu and Wu, 2007).

L'existence d'évènements de type « Kiss and Run » est toujours controversée dans les neurones. Des changements rapides de capacitance (« capacitance flickers »), interprétés comme du « Kiss and Run », ont été enregistrés dans des neurones d'hypophyses (Klyachko and Jackson, 2002). Encore une fois, les événements observés ne représentent qu'une petite proportion des événements d'exo-endocytose totaux dont la majorité s'apparente à de l'exocytose de type « Full Collapse ». Le même type de résultat a été obtenu sur la synapse en calyx (He et al., 2006). Le pore de fusion serait estimé à environ 1 nm avec une durée d'ouverture entre 10 ms et 2 sec.

Dans les neurones possédant des synapses de petite taille, l'étude du couplage de l'exo-endocytose s'avère plus complexe car il est impossible de réaliser des mesures de capacitance. Des travaux utilisant les sondes FM-Dyes et pHluorin ont été effectués sur des neurones d'hippocampe. Là encore, les résultats sont contradictoires et mettent en évidence des événements d'endocytose lents ou rapides (Sankaranarayanan and Ryan, 2000) (Granseth et al., 2006) (Gandhi and Stevens, 2003). Une étude ingénieuse basée sur l'utilisation combinée montre ainsi que lors de stimulation à basse fréquence, les événements d'exocytose de type « Kiss and Run » sont majoritaires (Harata et al., 2006b).

B- La cellule chromaffine et le neurone : deux modèles bien différents

Dans le cas des cellules neuronales, le débat reste ouvert. Contrairement aux granules de sécrétion, les vésicules synaptiques de petite taille ne contiennent qu'un seul type de molécule à libérer, les neurotransmetteurs. Une régulation de la libération de molécule par « Kiss and Run » ne serait pas qualitative mais seulement quantitative, ce qui va à l'encontre de la théorie du quanta de libération (DEL CASTILLO and KATZ, 1954). Quel est alors l'intérêt pour la cellule de réaliser ce type d'exo-endocytose ? Les partisans du « Kiss and Run » présentent ce mode de fusion comme un mode de fusion économique en énergie et en temps. Si la structure de la vésicule ou du granule reste « intacte » et couplée de façon spatio-temporelle, une endocytose coûtera moins de temps et d'énergie à la cellule. Cependant ce type d'exo-endocytose pourrait également aboutir à un encombrement de la zone active empêchant alors la fusion d'autres vésicules. Actuellement il est donc difficile de conclure sur l'existence ou non du « Kiss and Run » dans les neurones. De plus, il existe une grande variabilité anatomique et physiologique entre les différents types de neurones. Le nombre de vésicules, leur répartition au sein de différents pools et le nombre de zones actives varient

d'un type de neurones à l'autre (Rizzoli and Betz, 2005). Chaque type de neurones pourrait présenter des modes d'exocytose variables en fonction de ses particularités physiologiques.

Avec l'ensemble de ces données, il semble donc difficile d'établir un type d'exocytose commun aux cellules chromaffines et aux neurones. La comparaison n'est pas aisée à faire et les systèmes étudiés sont différents. Malgré une origine embryologique et une machinerie de l'exocytose globalement communes, il existe d'importantes différences entre les deux systèmes. Physiologiquement, les neurones doivent être capables de réaliser une exocytose très rapide, en revanche, la réponse des cellules chromaffines peut se faire dans des laps de temps plus long. Le signal calcique est également différent entre les deux types cellulaires. Le déclenchement de l'exocytose dans les neurones ou les cellules neuroendocrines ne requiert pas la même concentration en calcium. En effet, dans les cellules chromaffines, Augustine et Neher ont dialysé différentes concentrations calciques *via* une pipette de patch-clamp et ont mis en évidence que la concentration calcique seuil était de 0,3 μM (Augustine and Neher, 1992). En revanche, dans les neurones, la concentration seuil est beaucoup plus importante. Elle peut varier entre quelques μM pour la synapse en calyce de Held jusqu'à plusieurs centaines de μM dans les cellules bipolaire (Augustine et al., 2003).

C- La formation d'acide phosphatidique a-t-elle lieu dans les cellules neuronales?

L'implication directe du PA au cours de l'exocytose n'a pas été clairement mise en évidence dans les neurones. Dans la synapse cholinergique du ganglion buccal d'aplysie, l'équipe de Bernard Poulain a mis en évidence l'implication de Rac dans la neurosécrétion. L'utilisation de toxine ciblant cette protéine aboutit à un défaut d'exocytose. Les analyses électrophysiologiques suggèrent que Rac participe à la formation de sites de fusion (Doussau et al., 2000) (Humeau et al., 2002). Avec la même approche, les auteurs ont proposé un rôle semblable pour la PLD1 (Humeau et al., 2001). Tout laisse donc à penser que le modèle que nous avons mis en évidence se comporte de la même façon dans ce type de neurone. Une différence repose sur la localisation de Rac qui se situe sur les vésicules synaptiques alors qu'elle est plutôt présente dans la région subplasmallemale dans les cellules chromaffines. Cette différence dans la localisation pourrait suggérer une variation dans le mode de régulation.

Ces données n'ont pas été expérimentées dans d'autres types neuronaux. Cependant, quel que soit le type cellulaire, lors d'une exocytose permettant la formation de pore de fusion

suffisamment large, des courbures de membranes sont nécessaires. Il est donc fort possible que la formation de PA se produise dans tous les modèles neuronaux mais également dans les autres types de cellules sécrétrices. On ne peut cependant pas exclure une production de PA par le biais d'autres voies de synthèse (cf. page 38).

D- La translocation de phosphatidylsérine par la Scramblase peut-elle avoir lieu dans les neurones ?

A l'heure actuelle, peu d'études ont été réalisées dans des cellules chromaffines. Des travaux effectués sur des synaptosomes démontrant que l'activité sécrétrice est accompagnée d'un transport de PS du feuillet interne vers le feuillet externe (Lee et al., 2000). De plus l'addition de PS dans le milieu extracellulaire stimule la libération de neurotransmetteurs (Yang and Wang, 2009). Ces données démontrent l'importance de la translocation de PS au cours de l'exocytose. Ce transport de PS nécessaire à la neurotransmission est-il régulé par la scramblase ? Une seule étude fonctionnelle a été réalisée sur la jonction neuromusculaire de drosophiles n'exprimant plus la scramblase 1 et 2. Les auteurs observent une augmentation du nombre de granule arrimés et une augmentation de la sécrétion. Cependant, la translocation de PS ne semble pas être modifiée. L'hypothèse qu'ils avancent est un rôle de la scramblase dans un recrutement de partenaires protéiques nécessaires à l'exocytose plutôt que le transport de phospholipides. Cette conclusion est quelque peu hâtive car ils ont mesuré l'activité scramblase sur le PS en condition d'apoptose. Il aurait été plus judicieux de vérifier l'externalisation de PS spécifiquement induite par la stimulation de l'exocytose des neurones. Il est donc aujourd'hui impossible de conclure quand à un lien potentiel entre la scramblase, le transport du PS et la neurotransmission. La question du rôle de la scramblase indépendant du transport de PS reste ouverte.

Contrairement aux cellules chromaffines, l'endocytose compensatrice après « Full Collapse » a lieu en dehors des zones actives et la notion de couplage spatial ne semble pas s'appliquer aux neurones. Une des hypothèses que nous avançons pour expliquer le rôle de la translocation de PS au cours de l'endocytose compensatrice est qu'elle permet de libérer les domaines C2 de la synaptotagmine afin qu'elle puisse recruter des partenaires essentiels à ce processus. Or, dans les neurones d'hippocampe, il a été mis en évidence que ces domaines C2 sont nécessaires au recrutement d'une protéine adaptatrice impliquée au cours du recyclage des vésicules synaptiques : la stonine 2. L'absence de liaison entre la synaptotagmine et la stonine 2 aboutit à une inhibition du recyclage synaptique (Jung et al., 2007). La translocation

de PS pourrait avoir également lieu au cours de l'endocytose compensatrice dans les cellules neuronales. Dans l'hypothèse où la scramblase participe à ce processus, on pourrait imaginer une localisation de cette enzyme en dehors des zones actives, aux sites d'endocytose.

V- Conclusion

Nous venons de le voir, il existe des différences importantes entre les mécanismes d'exo-endocytose des cellules chromaffines et des neurones. Par souci de concision, je n'ai abordé que ces deux modèles. Cependant, différents types cellulaires sont employés pour étudier ces processus et malgré un processus cellulaire globalement commun, il existe une grande variabilité entre les systèmes. En effet, les mécanismes moléculaires et cellulaires de l'exo-endocytose ne sont pas identiques d'un système à l'autre et ceci est probablement le reflet de la variabilité physiologique. Ainsi, il est important de garder à l'esprit que des résultats obtenus dans un système donné, ne sont pas automatiquement valables dans les autres types cellulaires.

Précédemment, les travaux sur l'étude du processus de sécrétion tentaient avant tout de caractériser le mode de sécrétion et de mettre en évidence les acteurs protéiques. Cependant, et les résultats que j'ai obtenus durant ce doctorat en sont une bonne illustration, il faut désormais compter sur l'importance des lipides au cours de ces processus. Ils s'avèrent être des acteurs essentiels avec des rôles à la fois dans la courbure et la fluidité des membranes mais également dans l'activation et le recrutement des partenaires protéiques.

Enfin, la frontière entre le processus d'exocytose et celui de l'endocytose compensatrice est floue et ces deux mécanismes sont intimement liés. C'est la raison pour laquelle il est essentiel de réfléchir en termes de mécanismes globaux d'exo-endocytose. Afin de mieux appréhender ces processus cellulaires, il serait judicieux de définir une terminologie mieux adaptée en tenant compte d'autres critères comme la durée d'ouverture, le diamètre du pore de fusion et pourquoi pas, des partenaires moléculaires impliqués. En effet, à la complexité du processus étudié, s'ajoute une confusion dans la terminologie employée. En plus des termes génériques de « Kiss and Run » et « Full Collapse », on trouve dans la littérature les termes de « Kiss and Coat » (Sokac and Bement, 2006) « Kiss and glide » (Tsuboi et al., 2000) « fuse-pinch-and-linger » (Ryan, 2003) « cavcapture », « pure Kiss and Run », « mixed Kiss and Run » et « full Kiss and Run » (Tsuboi and Rutter, 2003), « endocytose rapide » et « endocytose lente » (Elhamdani et al., 2006a).

L'étude de la régulation des mécanismes de l'exo-endocytose a un long avenir devant elle. Devant des processus rapides et complexes, la combinaison des techniques et la collaboration entre biologistes cellulaires, biophysiciens des membranes et électrophysiologistes sera nécessaire

Matériels et méthodes

Par souci de clarté, j'ai choisi d'indiquer à la fin du chapitre la composition de la plupart des tampons et solutions de base utilisées au cours de ces travaux.

I- Techniques et outils de biologie moléculaire

A- Les ARN interférents (ARNi)

L'utilisation d'ARN interférents a pour but de réduire l'expression endogène d'une protéine d'intérêt. Un fragment d'ARN messenger double brin, appelé ARN interférents, va aboutir à la dégradation d'ARN messagers de séquence homologue présent dans le cellule. La méthode des RNA interférents en « épingle à cheveux » (« Small Hairpin ») a été décrite précédemment (Malacombe et al., 2006b). Un fragment d'ADN de 19 nucléotides codant pour une séquence d'ARN interférent dérivée du transcrit du gène cible, est séparée de sa séquence complémentaire inverse par une courte séquence de 9 nucléotides puis clonée dans un plasmide pGHsuper ou pEGFP-RNAi entre les sites de restrictions *Bgl*III et *Hind*III. L'expression du shRNA est sous le contrôle d'un promoteur H1-RNA. La GH et la GFP, contenues dans les vecteurs pGHsuper ou pEGFP-RNAi respectivement, sont sous le contrôle d'un promoteur. Les séquences utilisées sont issues de banques d'ADN complémentaires de rat ou de bœuf ou obtenues par Ambion[®]. Elles sont les suivantes : ATTCTATCACTAGCGTGAC pour le ARNi contrôle (ARNi UNR), CCATTTTGAACCAATGAAC pour le ARNi contre l'ARNm de Rac1, GAAGTCAAGCATTCTGTC pour le ARNi dirigé contre l'ARNm de RhoA, AGACCAAUUUCAGCAGACA pour le ARNi dirigé contre l'ARNm de la chaîne lourde de la Clatrine. Les séquences dirigées contre les ARNm de Cdc42, β Pix, Scrib ou PLD1 ont été décrites précédemment (Audebert et al., 2004) (Malacombe et al., 2006b) (Osmani et al., 2006) (Zeniou-Meyer et al., 2007) (**Figure 50**).

B- Les plasmides

Les plasmides codant pour les protéines suivantes Flag- β Pix, Flag- β PixL238R-L239S,

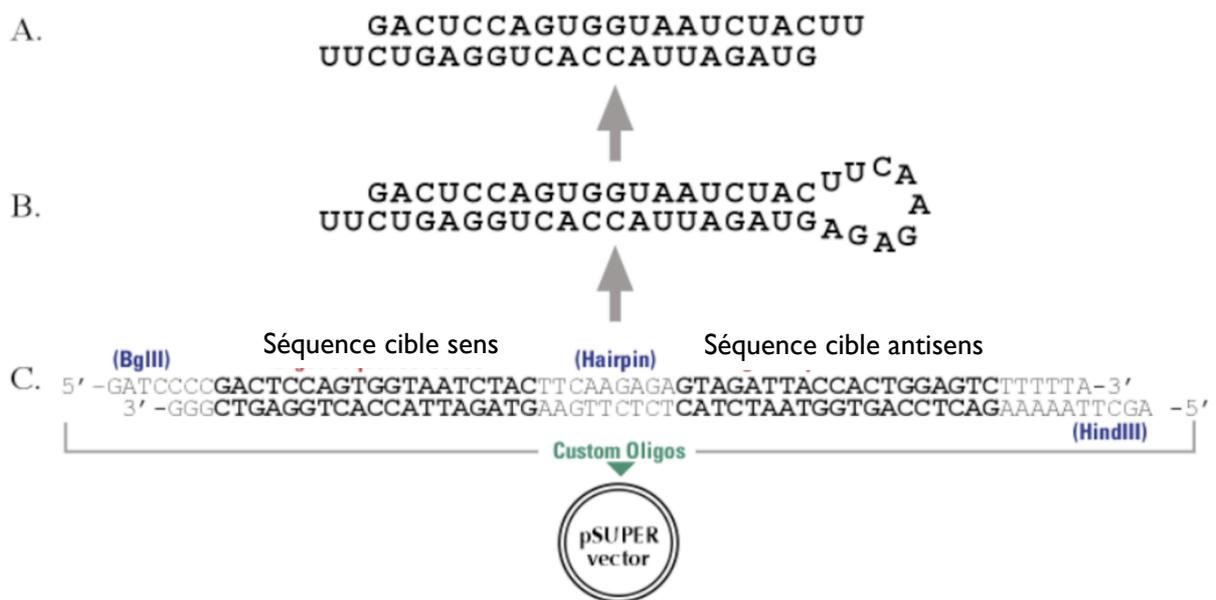


Figure 50 : Principe de l'ARN interférent en épingle à cheveux (Small Hairpin) : Les séquences ADN sens et anti-sens de l'ARN interférent sont insérées dans un plasmide (C) qui sera transfecté dans les cellules. Ce plasmide va coder pour une séquence d'ARNm en épingle à cheveux (B). Ce dernier sera ensuite clivé par la cellule pour obtenir un ARN interférent fonctionnel (A).

GFP-Scrib, GFP- Δ PDZ-Scrib, Yeast Spo20p PA-binding domain (wtPABD) ont été décrits précédemment (Audebert et al., 2004) (Malacombe et al., 2006b) (Osmani et al., 2006) (Zeniou-Meyer et al., 2007). La séquence d'ADNc humaine de Rac1 a été fournie par M. Way (Cancer Research UK, London, UK) et clonée dans un vecteur permettant l'expression d'une protéine portant une étiquette HA en N-terminal (fournie par H.W. Shin; Kyoto University) par Stéphane Gasman pour générer un plasmide codant pour HA-hRac1. La construction codant pour la séquence scramblase1 murine a été fournie par P. Sims (University of Rochester, N.Y., USA). Les plasmides contenant les séquences murines codant pour les protéines de la Dynamine1-HA murines, Dynamine1K44A-HA, Dynamine2-GFP, Dynamine2K44A-GFP ainsi que celui codant pour la protéine GFP-Eps15E Δ 95/295 ont été fournis par C. Lamaze et A. Benmerah (Institut Cochin, Paris, France). Les plasmides codant pour les protéines Phogrin-Phluorin, GPI-GFP et GFP-CD39 ont été fournis par S. Nagamatsu (Kyorin University, Tokyo, Japon), P. Boquet (INSERM U627, Nice, France) et S. Christophoridis (University of Ioannina, Grèce), respectivement.

C- Mutagénèse dirigée

Une mutation ponctuelle de la séquence codant pour la scramblase1 murine en position a été réalisée par mutagénèse dirigée QuickChange[®] II (Stratagene) selon le protocole du fournisseur afin de remplacer un aspartate en position 284 par une alanine (PLSCR1D284A) à l'aide des primers appropriés.

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 PfuUltra 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 par choc thermique. Les transformants sont étalés sur milieu LB solide en présence de kanamycine (30 μ g/ μ l). 2 ou 3 clones sont été isolés et l'ADN plasmidique est purifié en utilisant le kit Qiaprep spin miniprep (QIAGEN). L'introduction de la mutation est vérifiée par séquençage et les plasmides mutés sont ensuite amplifiés et purifiés en grande quantité dans des bactéries *E. coli* DH5 α avec le kit QIAGEN plasmid maxi.

D- Transformation et culture bactérienne

L'introduction d'un plasmide contenant le gène d'intérêt dans des bactéries est réalisée par la technique de transformation. Environ 100 ng de plasmide ou de produit de ligation sont ajoutés à 50 µl de bactéries *Escherichia Coli* (souche DH5α) rendues compétentes par la méthode utilisant le chlorure de calcium. Après une incubation de 20 minutes sur glace, l'entrée du plasmide est provoquée par un choc thermique (45 secondes à 42°C puis 2 minutes dans la glace). Les bactéries sont alors incubées dans 1 ml de milieu de culture LB à 37 °C pendant 1 heure, puis étalées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB solide et l'antibiotique nécessaire à la sélection des clones. Les plasmides contiennent un gène de résistance à un antibiotique (en général ampicilline ou kanamycine) et seules les bactéries ayant incorporé le plasmide survivront. La culture bactérienne a lieu à 37°C pendant au moins 12 heures.

E- Purification de plasmides recombinants : maxi-préparation d'ADN (Kit Qiagen)

Cette étape a pour but de purifier en grande quantité les plasmides recombinants, afin de les utiliser par la suite pour des transfections. Une colonie isolée de bactéries contenant le plasmide à amplifier est utilisée pour inoculer 2 à 5 ml de milieu LB contenant l'antibiotique approprié (Ampicilline : 100 µg/ml ; Kanamycine : 30 µg/ml). Après incubation pendant environ 8 heures à 37°C sous agitation (250 rpm), la pré-culture est diluée dans 200 ml de milieu LB contenant l'antibiotique. Cette suspension bactérienne est incubée pendant 12 à 16 heures sous agitation. Après 15 minutes de centrifugation à 5000 rpm à 4°C (Sorvall, SLA 1500), le culot bactérien est repris dans 10 ml de tampon de P1, les bactéries sont ensuite lysées dans 10 ml de tampon P2. L'ADN génomique et les protéines sont précipités par addition de 10 ml d'un tampon P3 à 4°C pendant 20 minutes. Le lysat obtenu est centrifugé à 13 000 rpm pendant 30 minutes à 4°C (Sorvall, SA 600). Le surnageant est déposé sur une colonne de résine échangeuse d'anions équilibrée avec 10 ml de tampon QBT, puis la colonne est lavée deux fois avec 30 ml de tampon QC. Le plasmide est élué dans 15 ml de tampon QF puis précipité avec 10,5 ml d'isopropanol et centrifugé à 11 000 rpm pendant 30 minutes à 4°C. Le culot d'ADN plasmidique est ensuite lavé avec 5 ml d'éthanol à 70% et re-centrifugé 10 minutes à 10000 rpm. A l'issue de cette centrifugation, le culot d'ADN est séché à l'air puis re-suspendu dans un volume adéquat d'eau stérile (300 à 500 µl selon la taille du culot).

La densité optique de l'échantillon est mesurée (à 260 et 280 nm) afin de déterminer la concentration et la pureté du plasmide. Si le rapport A260/280 est supérieur ou égal à 1,7 et que la concentration est d'au moins 1 µg/µl, nous estimons que le plasmide est utilisable pour une transfection.

II- Culture cellulaire et transfection

A- La lignée cellulaire PC12

1- Culture

La méthode de culture a déjà été décrite précédemment (Gasman et al., 2004). Les cellules PC12 sont cultivées dans un milieu DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium, Sigma D5796) complété en glucose (4,5 g/l) contenant 30 mM de NaHCO₃, 5% de sérum de veau fœtal, 10 % de sérum de cheval et un mélange d'antibiotiques pénicilline/streptomycine 100 U/ml et 100 µg/ml de Kanamycine pour obtenir du milieu DMEM complet). La culture se fait dans des boîtes de Pétri de 10cm de diamètre pré-traitées à la polylysine (10 µg/ml), les cellules sont passées deux fois par semaines. Le jour du passage, les cellules sont trypsinisées puis récupérées dans du DMEM complet. Après centrifugation 5 min à 800 rpm, elles sont remises en culture. Toutes les cultures se font à 37°C sous atmosphère enrichie en CO₂ (5%).

2- Transfection

(i) Transfection par agent lipidique

Pour les expériences d'immunofluorescence et de mesure de la sécrétion de GH, nous utilisons une technique de transfection d'ADN par agent lipidique, « Gene Porter[®] » (Gene Therapy Systems). Les cellules sontensemencées à une densité de 250 000 cellules par puits, dans des boîtes 4 puits pour les expériences d'immunofluorescence ou 24 puits pour les expériences de mesure de la sécrétion de GH. Après 24 heures de culture, un mélange contenant 0,5 µg d'ADN par puits + 5 µl de Gene Porter par µg d'ADN, dans 250 µl de DMEM sans sérum, est incubé 45 minutes à température ambiante puis déposé dans les puits contenant les cellules pour une durée de 5 heures à 37 °C. Le milieu est ensuite remplacé par du DMEM complet. Dans ces conditions, l'efficacité de transfection n'excède pas plus de

30%, c'est la raison pour laquelle nous utilisons un protocole d'électroporation pour les tests biochimiques.

(ii) Transfection par électroporation

Pour toutes les autres expériences, nous utilisons le système d'électroporation « Amaxa[®] » (Amaxa Biosystems). Les cellules sont transfectées le jour même du passage. Des culots cellulaires de $5 \cdot 10^6$ cellules sont repris dans 100 μ l d'agent de transfection « Nucleofector » fourni par le fabricant (Nucleofector for cells lines) auxquels sont ajoutés 3 μ g d'ADN. Le mélange est électroporé dans un appareil d'électroporation AMAXA avec le programme U29. Les cellules électroporées sont récupérées dans 500 μ l de DMEM complet, puis ensemencées dans différents types de boîtes qui varient en fonction de l'expérience réalisée. Le milieu est ensuite remplacé par du DMEM complet 5h après la transfection. L'efficacité de transfection se situe entre 50 et 80%.

Quelque soit le mode de transfection, les expériences sont réalisées 48 h après la transfection à l'exception de celles utilisant les ARN interférents dirigés contre les protéines Rac1, Cdc42, RhoA, PLD1, ainsi que les ARN interférent UnR où les expériences ont eu lieu 72 h après.

L'efficacité de transfection est mesurée par cytométrie en flux en utilisant le cytomètre FACSCalibur (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) et le logiciel CellQuest.

B- Les cellules chromaffines de bœuf en culture primaire

1- Mise en culture

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 ; NaHCO₃ 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 100 g 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 $\mu\text{g/ml}$ et pénicilline 100 U/). Le culot est resuspendu dans du DMEM et les cellules sont comptées à l'aide d'une cellule de Neubauer.

Les cellules sont ensemencées sur boîtes de pétri 10 cm ou sur des lamelles de 12 mm de diamètre recouvertes de fibronectine dans du milieu complet (DMEM contenant 10% de sérum fœtal de veau et des antimétabolites (cytosine arabinoside 10^{-5} M, 5-fluorodéoxyuridine 10^{-5} M)). Elles sont ensuite placées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ et 95% d'air saturé en vapeur d'eau pendant au moins trois jours avant utilisation.

2- Transfection

La transfection des cellules est effectuée par le protocole d'électroporation « Amaxa[®] » (Amaxa Biosystems) le jour même de la mise en culture. Des culots de $5 \cdot 10^6$ cellules sont repris dans 100 μl d'agent de transfection Nucleofector (Nucleofector for Primary Mammalian Neurons) additionné de 3 μg de plasmide. Les cellules sont électroporées avec l'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. Après 12 heures d'incubation à 37°C, le milieu est remplacé par du milieu DMEM complet. L'efficacité de transfection se situe entre 5 et 30%.

Les expériences ont toutes été réalisées 72 h après la transfection à l'exception de celles utilisant les plasmides codant pour les protéines Dynamine1 et Dynamine2, où les expériences ont eu lieu 48 h après la transfection.

III- Techniques biochimiques

A- Extraction et dosage de protéines

Pour préparer des extraits protéiques totaux, les cellules sont lavées avec du PBS froid puis incubées sur glace dans un tampon de lyse froid. Après grattage des puits, les extraits sont centrifugés à 14 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. La quantité de protéines dans les extraits est mesurée par la méthode du Bradford (réactif Bio-Rad Protein Assay, sur microplaques). Pour chaque condition, un volume de 2 µl est dosé. La gamme étalon est effectuée avec du sérum albumine bovine. La densité optique est mesurée à la longueur d'onde de 595nm avec un fluorimètre Mithras LB 940 (logiciel Mikrowin 2000, Berthold Technology). Les résultats sont analysés avec le logiciel Excel et comparés avec la gamme étalon.

B- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, électrotransfert sur membrane de nitrocellulose et immunodétection (Western Blot)

1- Anticorps utilisés

Pour les expériences de Western Blot, les anticorps primaires suivants ont été utilisés : monoclonal de souris anti-HA (Covance, 1:400), monoclonal de souris anti-Actin (Sigma, 1:5000), monoclonal anti-Cdc42 (BD Transduction Laboratories, 1:5000), monoclonal de souris anti-Rac1 (Sigma, 1:500), monoclonal de souris anti-RhoA (Santa Cruz biotechnology, 1:300), polyclonal de lapin βPix (Chemicon International, 1:500), polyclonal de chèvre anti-hScrib de chèvre (Santa Cruz Biotechnology, 1:200), monoclonal de souris anti-SNAP25 (Chemicon, 1:1000), polyclonal de lapin anti-DBH « Francium » (obtenu d'après le protocole de (Perrin and Aunis, 1985), 1:10 000).

Les anticorps secondaires suivants ont été utilisés : anti-souris et anti-lapin fournis dans le kit de révélation chimio-luminescence (ECL Supersignal® Substrate System, Pierce, 1 :1000), anti-chèvre (Santa Cruz, 1 :50 000).

2- Electrophorèse dénaturante

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 8, 10 ou 12% d'acrylamide en fonction du poids moléculaire des protéines étudiées. Les échantillons mélangés dans du tampon de charge sont dénaturés par chauffage à 95°C pendant 5 minutes. Après dépôt des échantillons sur le gel, la migration se fait à 80V jusqu'à leur pénétration dans le gel de séparation, puis à 120 V pendant 1 à 2 heures en fonction du degré de séparation souhaité dans un tampon de migration Tris-Glycine. Pour les expériences de perméabilisation à la saponine, nous avons utilisé des gels en gradient continu de 4 à 12% Bis-Tris avec le système XCell Surelock Mini-Cell (Invitrogen). Ces gels permettent de séparer aisément des protéines de poids moléculaires éloignés comme c'est le cas pour les protéines β Pix et SNAP25. La migration se fait alors à 200 V pendant 35 minutes dans le tampon de migration fourni par le fabricant (Invitrogen).

3- Electrotransfert sur membrane de nitrocellulose

Le transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose est réalisé selon le procédé de transfert humide décrit par Towbin (Towbin et al., 1979), sous l'effet d'un champ électrique de 120 V pendant 1 heure dans un tampon de transfert Tris Glycine. Dans le cas des gels en gradient continu, le transfert se fait à 30 V pendant 1h dans un tampon de transfert fourni par le fabricant (Invitrogen). L'efficacité de transfert est vérifiée en colorant rapidement la membrane dans une solution de solution de Rouge Ponceau qui permet de visualiser les protéines.

4- Immunodétection

La membrane obtenue après le transfert est brièvement lavée dans du TBS puis incubée pendant 1 heure, à température ambiante, 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, entre 30 minutes et 1 heure en fonction de l'anticorps utilisé, à température ambiante et sous agitation. Après 5 lavages de 5 minutes dans du TBS contenant 0,1% de Tween-20, la membrane est mise en contact avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase, dilué dans la solution de blocage, pendant 45 minutes à température ambiante et sous agitation. Après 5 nouveaux lavages de 5 minutes, l'activité de la peroxydase est révélée par chimio-luminescence (ECL Supersignal® Substrate System, Pierce).

Le signal est détecté en utilisant le système d'acquisition d'images par chemiluminescence « Chemi-smart 5000 » (Vilber Lourmat) et quantifié à l'aide du logiciel Bio-1D software (Vilber Lourmat).

C- Test de perméabilisation à la saponine

Les cellules sont lavées 2 fois avec 750 µl d'une solution de Locke Normal puis incubées 10 minutes dans 500 µl d'une solution de Locke Normal (Repos) ou d'une solution dépolarisante de potassium Locke K⁺59 mM (Stimulé). Les cellules sont ensuite lavées 2 fois dans une solution de Locke Normal et perméabilisées avec 300 µl d'une solution KG-ATP sans calcium (Repos) ou avec une solution de KG-ATP contenant 20 µM de calcium libre (Stimulé) complémenté de 0,05% de saponine. Les plaques contenant les cellules sont placées sous faible agitation à 4°C pendant 15 minutes. Les surnageants contenant les protéines cytoplasmiques sont ensuite récupérés. Les fractions membranaires sont solubilisées avec une solution de KG-ATP contenant 0,5 % de Triton X-100. Les fractions « totales » sont obtenues en incubant les cellules dans une solution de KG-ATP sans saponine. Les fractions sont ensuite analysées par Western Blot.

D- Mesure de l'activité de sécrétion de GH sur les cellules PC12

Afin d'étudier l'activité sécrétrice des cellules PC12, nous les transfectons avec des plasmides codant pour l'hormone de croissance humaine (hGH). Les PC12 n'expriment pas naturellement la hGH. De plus, différentes études ont montré que lorsque cette hormone est surexprimée, elle est stockée dans les granules de sécrétion puis libérée par exocytose après stimulation des cellules (Vitale et al., 2001) (Caumont et al., 1998). Nous utilisons donc cette hormone comme un marqueur quantifiable de l'activité sécrétrice. Lorsque nous réalisons des tests de sécrétion avec une approche par ARN interférent, une simple transfection suffit car la séquence de la hGH est présente dans le plasmide codant pour le ARN interférent. La quantité de hGH libérée dans le milieu extra-cellulaire rapporté à la quantité de GH encore contenue dans les cellules permet d'évaluer sélectivement l'activité sécrétrice des cellules ayant incorporé le plasmide. Dans les cas de surexpression de protéines, une co-transfection avec le vecteur codant pour la hGH est nécessaire. Le taux de co-transfection étant estimé à environ 80%, l'effet de la surexpression des protéines sur l'activité sécrétrice est mesuré avec une bonne corrélation.

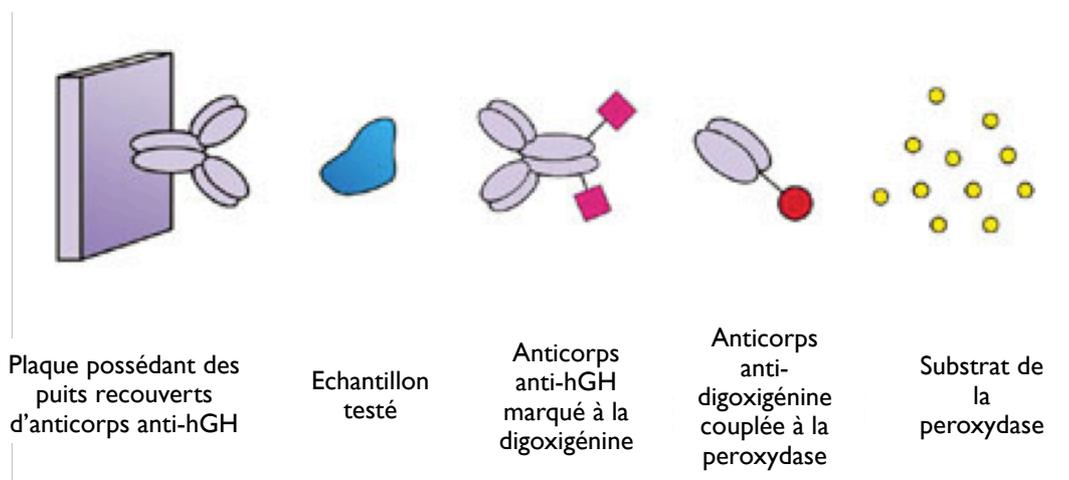


Figure 51 : Méthode de quantification de la hGH par le Kit « hGH ELISA » (Roche Diagnostics). Les lysats sont déposés sur des plaques de microtitrations recouvertes d'anticorps anti-hGH, un anticorps primaire anti-hGH marqué à la digoxigénine est ajouté suivi d'un anticorps secondaire anti-digoxigénine couplé à la peroxydase. Enfin un substrat de cette enzyme est ajouté, le produit obtenu génèrera un produit coloré quantifiable par mesure de l'absorbance.

Les cellules transfectées ont étéensemencées dans des plaques 24 puits. Elles sont lavées 4 fois avec 750 µl d'une solution de Locke Normal avec calcium puis incubées 10 minutes dans 500 µl d'une solution de Locke Normal avec calcium (Repos) ou d'une solution dépolarisante de potassium Locke K⁺59 mM (Stimulé). Les surnageants sont récupérés et centrifugés 5 min à 14 000 rpm. Les cellules au fond des puits sont incubées dans 1 ml de tampon Phosphate, puis lysées par 3 cycles de congélation/décongélation à – 80°C, puis récupérées et centrifugées 5 min à 14 000 rpm.

La quantité de hGH contenue dans chaque fraction est mesurée à l'aide d'un kit « hGH ELISA » (Roche Diagnostics) basé sur le principe de la méthode ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (**Figure 51**). Ce kit fournit des plaques de microtitrations recouvertes d'anticorps anti-hGH. 200 µl de chaque échantillon sont déposés dans les puits et incubés 1 heure à 37°C. Les échantillons sont alors lavés 6 fois dans du tampon de lavage fourni dans le Kit puis incubés avec un anticorps anti-hGH marqué à la digoxigénine (100 µg/ml). Après une heure d'incubation à 37°C et une nouvelle série de 6 lavages, les puits sont remplis par une solution d'anticorps anti-DIG couplée à la peroxydase. Après une heure d'incubation supplémentaire, le milieu est remplacé par une solution contenant un substrat de la peroxydase. L'enzyme va cliver le substrat et générer un produit coloré quantifiable par mesure de l'absorbance des solutions à 405 nm avec un fluorimètre Mithras LB 940 (logiciel Mikrowin 2000, Berthold Technology), l'absorbance à 490 nm servant de valeur de référence. En parallèle, une gamme étalon est réalisée avec des concentrations connues de hGH.

L'activité sécrétrice est exprimée en pourcentage d'hormone hGH sécrétée dans le milieu par rapport à la quantité totale de hGH produite par les cellules :

$$\% \text{ de sécrétion} = [\text{hGH sécrétée}] / ([\text{hGH sécrétée}] + [\text{hGH non sécrétée}]) * 100$$

La sécrétion nette des cellules correspond à la différence entre la sécrétion des cellules stimulées et des cellules non stimulées.

E- Mesure de l'activité PLD sur les cellules PC12

L'activité enzymatique de la PLD est mesurée au moment de la lyse avec le kit « Amplex red Phospholipase D assay » (Molecular Probes) (**Figure 52**).

Les cellules transfectées ont étéensemencées dans des plaques 24 puits. Les cellules

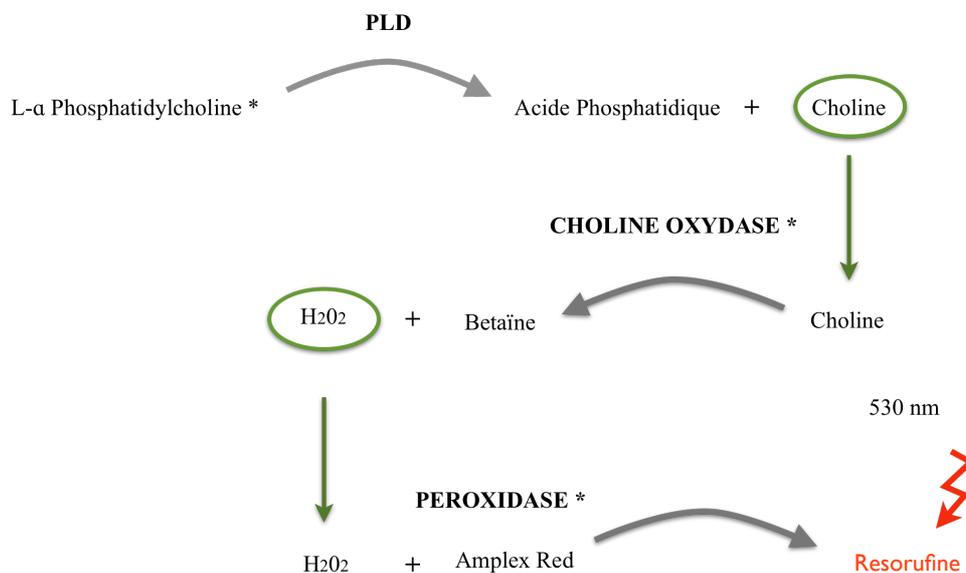


Figure 52 : Méthode de quantification de l'activité de la PLD par le Kit « Amplex red Phospholipase D assay » (Molecular Probes). Les lysats protéiques sont incubés avec une solution de dosage contenant de la L-alpha Phosphatidylcholine, de Choline Oxydase, de la peroxydase et de l'amplex Red. La présence de PLD active dans les lysats va induire une cascade enzymatique schématisée ci-dessus aboutissant à la formation de Resorufine. Cette substance émet de la fluorescence à 640 nm après excitation à 530 nm. * produits fournis dans le Kit.

sont lavées deux fois avec 750 µl d'une solution de Locke sans calcium libre, puis incubées 10 minutes dans 500 µl d'une solution de Locke sans calcium libre (Repos) ou d'une solution dépolarisante de potassium Locke K⁺59 mM (Stimulé). Le milieu est remplacé par 100µl de Tris 50mM froid à pH 8.0 puis les cellules sont lysées par 3 cycles de congélation/décongélation à -80°C. Un volume de 90 µl de lysat cellulaire est déposé dans une plaque 96 puits. Une solution de réaction est préparée à partir de réactifs contenus dans le kit « Amplex red Phospholipase D assay » comprenant de la peroxydase de radis noir (HRP), de la choline oxidase, de L-a-Phosphatidylcholine (lecithin) et de l'Amplex Red. Un volume de 90 µl de cette solution est déposé sur les lysats et la plaque 96 puits est incubée 45 minutes à 37°C. La fluorescence émise à 640 nm après une excitation à 530 nm est mesurée avec un fluorimètre Mithras (Berthold). Afin d'évaluer l'activité enzymatique de la PLD, une gamme étalon est réalisée en parallèle en utilisant une PLD purifiée provenant de *Streptomyces chromofuscus* (Sigma). Ce test enzymatique ne permet pas de discriminer l'activité des différentes isoformes de la PLD.

Le niveau d'activité est mesuré sur la totalité des cellules. Afin de mieux estimer l'effet de la transfection des différents plasmides, nous normalisons cette activité en tenant compte du taux de transfection.

Pour ce faire, nous utilisons la formule suivante :

$$tX + (1-t)Y = Z$$

où Z : activité globale du puits

X : activité des cellules transfectées par le plasmide d'intérêt

Y : activité des cellules « non transfectées »

t : taux de transfection

L'activité des cellules « non transfectées » est évaluée par la moyenne des activités obtenues dans les puits où les cellules sont transfectées avec le vecteur vide. Les analyses sont toujours effectuées en comparant les activités enzymatiques entre les cellules transfectées par les plasmides codant pour les protéines d'intérêt ou pour les ARN interférent et les cellules transfectées par les vecteurs vides. Nous avons vérifié au préalable que la transfection n'affectait pas l'activité PLD dans les cellules au repos et stimulées. L'activité nette

correspond à la différence entre la l'activité PLD des cellules stimulées et des cellules non stimulées

F- Mesure de l'activité Rac sur les cellules PC12

1- Technique de Pull Down

A l'exception des tests réalisés sur les cellules non transfectées, les cellules PC12 sont systématiquement transfectées avec un plasmide exprimant Rac-HA. Des expériences contrôles nous ont permis de montrer que le taux de co-transfection du vecteur codant pour HA-Rac avec les différents plasmides utilisés dans cette étude, est supérieur à 80%. De cette façon, la quantification de l'activation sera faite sur la GTPase surexprimée afin d'évaluer sélectivement l'effet des plasmides transfectés. Les échantillons seront incubés en présence de billes d'agarose auxquelles est associé le domaine CRIB de la protéine PAK (p21 activated kinase). PAK est un effecteur de Rac et Cdc42, et CRIB correspond au domaine de liaison des GTPases à leur effecteur. Seules les formes actives de Rac et Cdc42 pourront se lier aux billes. Après centrifugation, un Western Blot sera effectué et l'on révélera la présence des GTPase actives avec un anticorps dirigé contre HA (ou dirigé contre Rac1 pour les expériences réalisées sur les cellules non transfectées).

Les cellules transfectées ont étéensemencées dans des boîtes de pétri de 10 cm. Les cellules sont lavées deux fois dans du Locke Normal sans calcium, puis incubées 10 minutes dans 10 ml d'une solution de Locke Normal sans calcium (Repos) ou d'une solution dépolarisante de potassium Locke K⁺59 mM (Stimulé). Les boîtes de pétri contenant les cellules sont ensuite posées sur glace, lavées 1 fois dans du PBS froid et lysées dans 500 µl d'un tampon de lyse froid, puis centrifugées 10 minutes à 14000 rpm à 4°C. Après prélèvement d'un aliquot de 50 µl, le surnageant restant est rapidement incubé dans de l'azote liquide et mis à -80°C. Cette étape permet d'effectuer un dosage protéique des lysats tout en préservant les GTPases Rac sous leur état initial au moment de la lyse. Après dosage protéique par la méthode du micro-bradford (Biorad), les échantillons mis à -80°C sont récupérés et pour chaque condition, 600 µg de protéines sont incubés avec les billes d'agarose pendant une heure à 4°C sous agitation. Les billes sont ensuite lavées trois fois dans du tampon de lyse, re-suspendues dans 10 µl de tampon de charge et les protéines sont séparées sur un gel d'acrylamide 12%.

2- Rac-G-Lysat

Cette autre méthode de quantification de la forme active de Rac est analysée en utilisant le kit « Rac1,2,3 G-LISA™ Activation Assay® » (Cytoskeleton) basé sur le principe de la méthode ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Des plaques 96 puits recouvertes de domaines de liaison à un effecteur de Rac sont fournies dans le Kit. Les lysats cellulaires obtenus sont déposés sur ces plaques et une série d'incubations avec des anticorps primaires puis secondaires va permettre de déterminer la quantité de Rac-GTP présente. La composition des réactifs du kit n'est pas communiquée par le fournisseur.

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 6 puits. Les cellules sont lavées et stimulées de la même façon que pour l'expérience de Pull Down dans des volumes de 500 µl. La lyse est effectuée à froid à l'aide de 80 µl d'un tampon de lyse fourni dans le Kit. Après avoir effectué un dosage protéique, 170 µg de protéines pour chaque échantillon sont déposés dans les puits de la microplaque qui est incubée 30 min à 4°C sous agitation à 400 rpm. Après deux lavages à l'aide du tampon de lavage (« Wash Buffer »), la plaque est incubée 2 minutes à température ambiante dans la solution « Antigen Presenting Buffer ». Une série de 3 lavages puis une incubation de 45 min à TA sous agitation à 400 rpm sont effectués avec une solution d'anticorps primaire anti-Rac. Après 3 nouveaux lavages, les puits sont incubés 45 min à TA sous agitation à 400 rpm dans une solution d'anticorps secondaire couplée à la peroxydase et reconnaissant l'anticorps primaire précédemment incubé. Enfin, une dernière série de lavage est effectuée suivie d'une incubation avec une solution « HRP Detection Reagent » permettant de révéler l'activité de la peroxydase. L'absorbance émise à 490 nm est mesurée au fluorimètre Mithras (Berthold).

G- Expériences de biotinylation sur les cellules chromaffines

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 4 puits contenant des lamelles de verre recouvertes de fibronectine. Elles sont lavées deux fois avec 750 µl d'une solution de Locke Normal sans calcium puis incubées 10 minutes soit dans 500 µl d'une solution de Locke Normal sans calcium (Repos), soit dans 500 µl d'une solution dépolarisante de potassium Locke K⁺59 mM ou dans une solution de Locke Normal sans calcium contenant 10 µM de nicotine (Stimulé). Les protéines présentes à la surface des cellules sont biotinylées avec le kit « Pinpoint™ Cell Surface Protein Isolation Kit » (Pierce). Les cellules sont lavées deux fois avec du PBS froid puis incubées avec de la Sulfo-NHS-SS-Biotin (0.25 mg/ml)

pendant 30 minutes à 4°C, puis lavées rapidement deux fois avec une solution de Locke Normal sans calcium froid. Elles sont ensuite incubées à 37 °C à des temps différents afin de réaliser des internalisations plus ou moins longues. La biotine restante en surface cellulaire est clivée par une incubation par une solution de glutathion 50 mM à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées puis lysées dans un tampon de lyse froid. Les protéines biotinylées sont précipitées par incubation avec des billes recouvertes de Neutravidine (Pierce) pendant 1 h à température ambiante. Après centrifugation des billes, les protéines DBH biotinylées sont analysées par Western Blot.

IV-Technique utilisant la microscopie

A- Anticorps et toxines utilisés

Les anticorps primaires suivants ont été utilisés : monoclonal de souris anti-Rac1 (Sigma, 1:100), monoclonal de souris anti-RhoA (Santa Cruz biotechnology, 1:50), polyclonal de lapin βPix (Chemicon International, 1:200), monoclonal de souris anti-SNAP25 (Chemicon, 1:100), polyclonal de lapin anti-DBH « Francium » (obtenus d’après le protocole de (Perrin and Aunis, 1985), 1:1000), monoclonal de souris anti-HA (Covance, 1:500), polyclonal de lapin anti-GH humaine (fourni par le Dr. A.F. Parlow (NIDDKs National Hormone and Pituitary Program, Torrance, CA, 1:200), monoclonal de souris anti-clathrin heavy chain (Sigma, 1:200), polyclonal de lapin anti-VMAT2 (fourni par C. Sagné (IPCB, Paris, France))

Les anticorps secondaires anti-souris et anti-lapin couplés aux Alexa 488, 555 ou 647 proviennent de chez Molecular Probes et sont utilisés avec une dilution de 1:1000.

B- Immunocytochimie et microscopie confocale

1- Immunocytochimie

Pour toutes les expériences de cytochimie, les cellules PC12 ou chromaffines ont été préalablement ensemencées dans des plaques 4 puits contenant des lamelles de verre recouvertes de polylysine ou de fibronectine respectivement.

(i) Protocole classique

Les cellules sont lavées deux fois pendant 5 minutes avec une solution de Locke Normal. Elles sont ensuite incubées pendant 10 minutes dans 500 µl de solution de Locke Normal (Repos) ou dans 500 µl d'une solution dépolarisante de potassium Locke K⁺59 mM (Stimulé). Les cellules chromaffines peuvent être aussi stimulées dans une solution de Locke Normal contenant 10 µM de nicotine. Les cellules sont immédiatement fixées avec 300 µl d'une solution de paraformaldéhyde à 4 % pendant 15 minutes à température ambiante, puis perméabilisées durant 10 minutes dans 300 µl de paraformaldéhyde contenant 0,1% de Triton X-100. Après 5 lavages avec du PBS, les sites de liaison non-spécifiques sont saturés 45 minutes à 37°C avec 300 µl de PBS contenant 3% de BSA (« Bovine Serum Albumin ») et 10% de sérum de chèvre. Les lamelles sont ensuite incubées avec 50 µl d'anticorps primaires (dilués dans le PBS-BSA 3%) à 37°C pendant 1h. Les lamelles sont lavées 5 fois avec du PBS, puis incubées durant 30 minutes à 37°C avec l'anticorps secondaire couplé au fluorochrome adéquat (dilué dans du PBS-BSA 3%). Après une dernière série de lavages avec du PBS, les lamelles sont rincées à l'eau ultra-pure, séchées, et montées sur lame dans un milieu de montage Mowiol-Elvanol. Après polymérisation du milieu de montage (environ 12 h), les cellules sont prêtes pour l'observation en microscopie à fluorescence.

(ii) Marquage extracellulaire avec l'annexine V

Les cellules sont dans un premier temps rincées deux fois 5 minutes avec une solution de Locke Normal, puis incubées pendant 15 min (dans papier voir avec stef G) avec une solution de Locke Normal (Repos) ou une 500 µl d'une solution dépolarisante de potassium Locke K⁺59 mM (Stimulé) contenant de l'annexine V couplée à un Alexa 568 diluée au ¼. Les cellules sont ensuite directement fixées avec une solution de paraformaldéhyde à 4% et rincées 5 fois dans du PBS. Les lamelles peuvent être montées sur lame dans un milieu de montage Mowiol-Elvanol.

(iii) Test d'internalisation de la DBH sur cellules chromaffines

Les cellules sont lavées deux fois avec 750 µl d'une solution de Locke Normal sans calcium puis incubées 10 minutes dans 500 µl d'une solution de Locke Normal sans calcium (Repos), ou d'une solution dépolarisante de potassium Locke K⁺59 mM, ou une solution de Locke Normal sans calcium contenant 10 µM de nicotine (Stimulé). Les cellules sont placées sur glace et lavées deux fois avec une solution de Locke Normal sans calcium froid puis incubées 1 h à 4°C dans une solution de Locke Normal sans calcium froid contenant l'anticorps anti-DBH. Elles sont ensuite rapidement lavées 2 fois, et sont soit fixées (condition stimulé), soit incubées à 37 °C à temps différents pour les conditions

d'internalisation. Après 3 lavages rapides avec une solution de Locke Normal sans calcium, les cellules sont fixées puis perméabilisées. Les étapes suivantes sont réalisées dans les mêmes conditions que le protocole de cytochimie classique.

Pour tester l'effet du dynasore, à partir du dernier lavage et jusqu'à la fixation des cellules, tous les milieux utilisés contiennent 80 μ M de dynasore dilué dans 0,01% de DMSO 0,01% de seul est ajouté dans les milieux utilisés pour les cellules contrôles.

2- Microscopie confocale

Les acquisitions sont effectuées au microscope confocal à balayage laser ZEISS Axiovert 510 avec le programme ZEISS LSM permettant d'effectuer des coupes virtuelles de 0,2 à 0,3 μ m, le pinhole utilisé étant de 0,7 μ m. Les protéines fluorescentes sont visualisées à l'aide d'un laser Hélium/Néon, capable d'exciter les fluorophores à la longueur d'onde de 543nm émettant dans le rouge (rhodamine, RFP ou Alexa 555 ou 568), d'un laser Argon, capable d'exciter les fluorophores à la longueur d'onde de 488nm émettant dans le vert (GFP ou Alexa 488) et d'un laser un laser Hélium/Néon ($\lambda = 633$ nm), émettant dans l'ultra-rouge (Alexa 647). Les images sont générées en 8 bits.

3- Quantification

(i) Co-localisation

La proportion de Rac1/PABD-GFP colocalisée avec SNAP25 a été estimée à partir des pixels doublement marqués avec le logiciel Zeiss CLSM 3.2 (Carl Zeiss, Jena, Germany). La proportion de co-localisation est exprimée en intensité moyenne de fluorescence normalisée sur la surface correspondante, et calculée en pourcentage de la fluorescence de Rac1/PABD-GFP détectée dans chaque cellule.

(ii) Quantification de l'internalisation de la DBH par la méthode de carte de distance Euclidienne

L'approche de quantification par carte de distance Euclidienne (EDM : Euclidean distance map) est une méthode utilisée en biologie cellulaire pour mesurer la distance entre deux objets (Schober et al., 2007). Le principe de cette technique de quantification est basé sur la transformation Euclidienne des distances qui convertit une image digitale binaire constituée de pixels en une autre image où chaque pixel possèdera une valeur de la distance Euclidienne minimale par rapport à un point donné. (Shih and Wu, 2004). Cette technique a

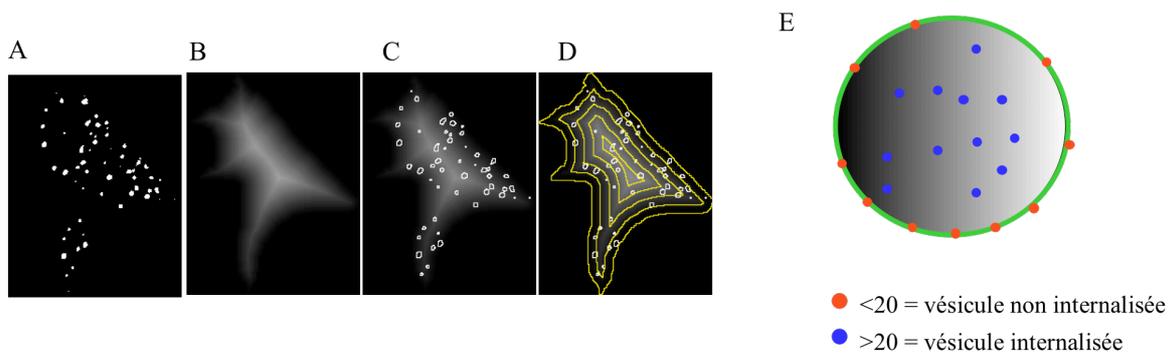


Figure 53: Méthode de quantification de l'internalisation de la DBH utilisant la transformation de carte de distance Euclidienne. A- Acquisition de départ obtenue à partir d'un test d'internalisation de la DBH sur des cellules chromaffines. B- Transformation de l'acquisition A en carte de distance Euclidienne en valeur de niveau de gris. C- Après traitement de seuillage et de segmentation de l'acquisition, l'image obtenue est reportée sur la carte de distance Euclidienne. D- Chaque vésicule possèdera une valeur de distance relative par rapport à la membrane. E- Les vésicules présentant une valeur $>$ à 20 seront considérées comme internalisées.

été adaptée au laboratoire par Stéphane Ory. Elle nous permet d'évaluer l'internalisation des vésicules présentant un marquage DBH.

Les acquisitions des tests d'internalisation de DBH sont réalisées avec les caractéristiques suivantes: 1024x1024, objective x63 N/A 1.3. Un contour de la périphérie cellulaire est effectué puis, une image binaire obtenue à partir de cette sélection permettra de créer une carte de distance Euclidienne de la cellule d'intérêt. Parallèlement, l'acquisition de départ est traitée par un seuillage afin de diminuer le bruit de fond, puis par une étape de segmentation qui va permettre d'isoler les vésicules. Chaque vésicule sera alors transformée en région d'intérêt. Ces régions d'intérêt seront ensuite rapportées sur la carte de distance Euclidienne précédemment obtenue. Chacune possèdera une valeur relative correspondant à la distance par rapport à la membrane plasmique. Par différents marquages membranaires, nous avons évalué dans les cellules chromaffines l'épaisseur de la membrane plasmique à une valeur de 20 sur une carte de distance Euclidienne. Les vésicules présentant une valeur supérieure à 20 sont considérées comme des vésicules internalisées (**Figure 53**).

Toutes les acquisitions ont été quantifiées avec le logiciel ImageJ auquel nous avons ajouté un module "MRI Cell Image Analyzer" (Baecker and Travo, 2006). Un "pluggin" a été créé en place par Stéphane Ory afin d'automatiser l'ensemble des étapes.

C- Test d'internalisation de la DBH en microscopie électronique

Les expériences de microscopie électronique sont effectuées en collaboration avec Anne-Marie Haeberlé (IE CNRS) dans l'équipe de Yannick Bailly. Les tests d'internalisation sont identiques à ceux réalisés pour une observation en microscopie à fluorescence jusqu'à l'étape de fixation. Les cellules sont fixées 30 minutes à température ambiante dans un tampon de fixation contenant 4% de paraformaldehyde et 0,3 % de glutaraldehyde pendant 30 minutes. Une perméabilisation de 15 minutes est effectuée dans un tampon contenant 4% de paraformaldehyde et 0,05 de Triton X-100. Les cellules sont lavées deux fois 6 minutes dans du PBS puis une étape de saturation de 10 minutes à température ambiante est effectuée dans une solution de PBS complétée de 0,15% de BSA acétylée (Aurion). Des anticorps secondaires anti-lapin couplés à des billes d'or colloïdal de 0,8 nm de diamètre sont incubés 12 h à 4 °C dans du PBS complété de 0,15% de BSA acétylée. Les échantillons sont lavés avec du PBS puis post-fixés au glutaraldéhyde 2% dans du PBS. Une série de lavages utilisant du PB et de l'eau est effectué suivi d'une intensification du marquage des billes d'or

avec une solution d'Ag-ME est réalisé pendant 1 h à 24 °C. Après plusieurs lavages avec du PB, les échantillons sont post-fixés avec 0,5% de tétroxyde d'osmium (OsO₄), déshydratés à l'éthanol par plusieurs bains de degré alcoolique croissant, traités à l'hexaméthylidisilazane et séchés à l'air. Les observations sont réalisées grâce à un microscope électronique à transmission Hitachi 7500.

V- Tampons et solutions utilisées

A- Technique de biologie moléculaire :

Culture bactérienne :

Milieu de culture LB : Tryptone 10 g/l; extrait de levures 5 g/l; NaCl 10 g/l.

Maxi-préparation :

Tampon P1 : 50 mM Tris HCl; 10 mM EDTA pH 8; 100µg/ml de RNase A.

Tampon P2 : NaOH 200 mM; 1% SDS.

Tampon P3 : 3 M acétate de potassium; pH 5,5.

Tampon QBT : 750 mM NaCl; 50 mM MOPS pH 7; 15 % d'isopropanol; 0,15% Triton X-100.

Tampon QC : 1M NaCl; 50 mM MOPS pH 7; 15 % isopropanol.

Tampon QF : 1,25 M NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 8,5; 15% isopropanol.

B- Milieux de lavages et de stimulations

Locke sans calcium: 140 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 2,5 mM CaCl₂; 1,2 mM KH₂PO₄; 1,2 mM MgSO₄; 0,01 mM EDTA; 11 mM glucose et 15 mM Hepes pH 7,2.

Locke Normal avec calcium: 140 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 2,5 mM CaCl₂; 1,2 mM KH₂PO₄; 1,2 mM MgSO₄; 0,001 mM EDTA; 11 mM glucose et 15 mM Hepes pH 7,2.

Locke sans calcium Libre: 140 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 2,5 mM CaCl₂; 1,2 mM KH₂PO₄; 1,2 mM MgSO₄; 10 mM EGTA; 11 mM glucose and 15 mM Hepes pH 7,2.

Locke K⁺59 mM : 86,9 mM NaCl; 59 mM KCL; 2,5 mM CaCl₂; 1,2 mM KH₂PO₄; 1,2 mM

MgSO₄; EDTA 0,01 mM et 15 mM HEPES pH 7,2.

KG-ATP sans calcium : 150 mM potassium glutamate; 10 mM Pipes pH 7,2; 5 mM nitrilotriacetic acid; 0,5 mM EGTA; 5 mM Mg²⁺-ATP; 4,5 mM magnesium acétate; cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma).

KG-ATP contenant 20 µM de calcium libre : 150 mM potassium glutamate; 10 mM PIPES; pH 7,0; 5 mM nitrilotriacetic acid; 0,5 mM; EGTA; 5 mM Mg²⁺-ATP; 3,75 mM magnesium acetate; 1,14 mM CaCl₂; cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma).

C- Techniques biochimiques

Extraction de protéines :

Tampon de lyse : Hepes pH 7,5 50 mM; NaCl 150 mM; MgCl₂ 1,5 mM ; EDTA 5 mM; Glycerol 1%; triton 1%; cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma).

Tampon de charge : 10 mM Tris HCl pH 8; 1mM EDTA; 20 mM DTT; 3% SDS ; 10 % glycérol, 0,001% bleu de bromophénol.

Western Blot :

Tampon de migration Tris Glycine : Tris-HCl 25 mM; glycine 192 mM; SDS 0,1%; pH8,3.

Tampon de transfert Tris Glycine : Tris-HCl 20 mM; glycine 155 mM; SDS 0,02%; éthanol 20% (vol/vol); pH 8,3.

Tampon de migration Bis-Tris (20 X) fournit par Invitrogen : MES 50 mM; Tris base 50 mM; SDS 0,1%; EDTA 1 mM; pH 7,3.

Tampon de migration Bis-Tris (20 X) fournit par Invitrogen : Bicine 25 mM; Bis-Tris 25 mM; EDTA 1 mM; pH 7,2.

Solution de rouge Ponceau : rouge Ponceau 0,5%; acide acétique 1%; éthanol 20%.

TBS : Tris-HCl 20 mM; NaCl 137 mM; pH 7,6.

Test de sécrétion de hGH

Tampon Phosphate : K₂HPO₄ 20 mM; KH₂PO₄ 4,95 mM.

Test d'activité Rac par « Pull down »

Tampon de lyse : Hepes 125 mM pH 7,5; NaCl 750 mM; Igepal CA-630 5%; MgCl₂ 50 mM; EDTA 5 mM; glycerol 10%; cocktail d'inhibiteur de protéases (Sigma).

Expériences de biotinylation :

Tampon de lyse : Hepes 50 mM pH 7,5; NaCl 150 mM; MgCl₂ 1,5 mM; EGTA 5 mM; Triton X-100 1%; glycérol 1%; cocktail d'inhibiteur de protéases (Sigma).

D- Technique utilisant la microscopie

Cytochimie pour microscopie à Fluorescence

Tampon de fixation : K₂HPO₄ 120 mM; NaH₂PO₄ 120 mM ; paraformaldéhyde 4 %; pH 7,2.

PBS : NaCl 37 mM ; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 4,3 mM; KH₂PO₄ 1.47 mM; pH 7,4.

Bibliographie

A

Abdel-Latif, D., Steward, M., Macdonald, D. L., Francis, G. A., Dinauer, M. C. and Lacy, P. (2004). Rac2 is critical for neutrophil primary granule exocytosis. *Blood* 104, 832-9.

Acharya, U., Edwards, M. B., Jorquera, R. A., Silva, H., Nagashima, K., Labarca, P. and Acharya, J. K. (2006). Drosophila melanogaster Scramblases modulate synaptic transmission. *J Cell Biol* 173, 69-82.

Ahras, M., Otto, G. P. and Tooze, S. A. (2006). Synaptotagmin IV is necessary for the maturation of secretory granules in PC12 cells. *J Cell Biol* 173, 241-51.

Ales, E., Tabares, L., Poyato, J. M., Valero, V., Lindau, M. and Alvarez de Toledo, G. (1999). High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism. *Nat Cell Biol* 1, 40-4.

Alonso, M. T., Barrero, M. J., Michelena, P., Carnicero, E., Cuchillo, I., Garcia, A. G., Garcia-Sancho, J., Montero, M. and Alvarez, J. (1999). Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in chromaffin cells seen from inside the ER with targeted aequorin. *J Cell Biol* 144, 241-54.

Amir-Moazami, O., Alexia, C., Charles, N., Launay, P., Monteiro, R. C. and Benhamou, M. (2008). Phospholipid scramblase 1 modulates a selected set of IgE receptor-mediated mast cell responses through LAT-dependent pathway. *J Biol Chem* 283, 25514-23.

Aoki, K., Nakamura, T. and Matsuda, M. (2004). Spatio-temporal regulation of Rac1 and Cdc42 activity during nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J Biol Chem* 279, 713-9.

Aoyagi, K., Sugaya, T., Umeda, M., Yamamoto, S., Terakawa, S. and Takahashi, M. (2005). The activation of exocytotic sites by the formation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate microdomains at syntaxin clusters. *J Biol Chem* 280, 17346-52.

Archer, D. A., Graham, M. E. and Burgoyne, R. D. (2002). Complexin regulates the closure of the fusion pore during regulated vesicle exocytosis. *J Biol Chem* 277, 18249-52.

Artalejo, C. R., Elhamedani, A. and Palfrey, H. C. (2002a). Sustained stimulation shifts the mechanism of endocytosis from dynamin-1-dependent rapid endocytosis to clathrin- and dynamin-2-mediated slow endocytosis in chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6358-63.

Artalejo, C. R., Elhamedani, A. and Palfrey, H. C. (2002b). Sustained stimulation shifts the mechanism of endocytosis from dynamin-1-dependent rapid endocytosis to clathrin- and dynamin-2-mediated slow endocytosis in chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 6358-63.

Artalejo, C. R., Henley, J. R., McNiven, M. A. and Palfrey, H. C. (1995). Rapid endocytosis coupled to exocytosis in adrenal chromaffin cells involves Ca²⁺, GTP, and dynamin but not clathrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 8328-32.

Artalejo, C. R., Lemmon, M. A., Schlessinger, J. and Palfrey, H. C. (1997). Specific role for the PH domain of dynamin-1 in the regulation of rapid endocytosis in adrenal chromaffin cells. *EMBO J* 16, 1565-74.

Aspenstrom, P., Fransson, A. and Saras, J. (2004). Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J* 377, 327-37.

Audebert, S., Navarro, C., Nourry, C., Chasserot-Golaz, S., Lécine, P., Bellaïche, Y., Dupont, J. L., Premont, R. T., Sempéré, C., Strub, J. M. et al. (2004). Mammalian Scribble forms a tight complex with the betaPIX exchange factor. *Curr Biol* 14, 987-95.

Augustine, G. J. and Neher, E. (1992). Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 450, 247-71.

Augustine, G. J., Santamaria, F. and Tanaka, K. (2003). Local calcium signaling in neurons. *Neuron* 40, 331-46.

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 Garcia, A. G. (1981). Correlation between catecholamine secretion from bovine isolated chromaffin cells and [3H]-ouabain binding to plasma membranes. *Br J Pharmacol* 72, 31-40.

Aunis, D. and Langley, K. (1999). Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Acta Physiol Scand* 167, 89-97.

Axelrod, D., Thompson, N. L. and Burghardt, T. P. (1983). Total internal reflection fluorescent microscopy. *Journal of microscopy* 129, 19-28.

B

Bader, M. F., Ciesielski-Treska, J., Thierse, D., Hesketh, J. E. and Aunis, D. (1981). Immunocytochemical study of microtubules in chromaffin cells in culture and evidence that tubulin is not an integral protein of the chromaffin granule membrane. *J Neurochem* 37, 917-33.

Bader, M. F., Garcia, A. G., Ciesielski-Treska, J., Thierse, D. and Aunis, D. (1983). Contractile proteins in chromaffin cells. *Prog Brain Res* 58, 21-9.

Bader, M. F., Simon, J. P., Sontag, J. M., Langley, K. and Aunis, D. (1990). Role of calcium in secretion and synthesis in bovine adrenal chromaffin cells. *Adv Exp Med Biol* 269, 93-7.

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.

Bagrodia, S., Taylor, S. J., Jordon, K. A., Van Aelst, L. and Cerione, R. A. (1998). A novel regulator of p21-activated kinases. *J Biol Chem* 273, 23633-6.

Bai, J. and Chapman, E. R. (2004). The C2 domains of synaptotagmin--partners in exocytosis. *Trends Biochem Sci* 29, 143-51.

Becherer, U., Moser, T., Stuhmer, W. and Oheim, M. (2003). Calcium regulates exocytosis at the level of single vesicles. *Nat Neurosci* 6, 846-53.

Becherer, U. and Rettig, J. (2006). Vesicle pools, docking, priming, and release. *Cell Tissue Res* 326, 393-407.

Béglé, A., Tryoen-Tóth, P., de Barry, J., Bader, M. F. and Vitale, N. (2009). ARF6 regulates the synthesis of fusogenic lipids for calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine cells. *J Biol Chem*.

Benmerah, A. and Lamaze, C. (2007). Clathrin-coated pits: vive la différence? *Traffic* 8, 970-82.

Berberian, K., Torres, A. J., Fang, Q., Kisler, K. and Lindau, M. (2009). F-actin and myosin II accelerate catecholamine release from chromaffin granules. *J Neurosci* 29, 863-70.

Bernards, A. (2003). GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and Drosophila. *Biochim Biophys Acta* 1603, 47-82.

Bhalla, A., Tucker, W. C. and Chapman, E. R. (2005). Synaptotagmin isoforms couple distinct ranges of Ca²⁺, Ba²⁺, and Sr²⁺ concentration to SNARE-mediated membrane fusion. *Mol Biol Cell* 16, 4755-64.

Billuart, P., Bienvenu, T., Ronce, N., des Portes, V., Vinet, M. C., Zemni, R., Roest Crollius, H., Carrie, A., Fauchereau, F., Cherry, M. et al. (1998). Oligophrenin-1 encodes a rhoGAP protein involved in X-linked mental retardation. *Nature* 392, 923-6.

Bishop, A. L. and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348 Pt 2, 241-55.

Bittner, G. D. and Kennedy, D. (1970). Quantitative aspects of transmitter release. *J Cell Biol* 47, 585-92.

Boggs, J. M. (1987). Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function. *Biochim Biophys Acta* 906, 353-404.

Boquet, P. (2000). Small GTP binding proteins and bacterial virulence. *Microbes Infect* 2, 837-43.

Brennwald, P. and Rossi, G. (2007). Spatial regulation of exocytosis and cell polarity: yeast as a model for animal cells. *FEBS Lett* 581, 2119-24.

Bunney, T. D. and Katan, M. (2006). Phospholipase C epsilon: linking second messengers and small GTPases. *Trends Cell Biol* 16, 640-8.

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

Burridge, K. and Wennerberg, K. (2004). Rho and Rac take center stage. *Cell* 116, 167-79.

C

Cai, H., Reim, K., Varoqueaux, F., Tapechum, S., Hill, K., Sorensen, J. B., Brose, N. and Chow, R. H. (2008). Complexin II plays a positive role in Ca²⁺-triggered exocytosis by facilitating vesicle priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19538-43.

Calì, C., Marchaland, J., Regazzi, R. and Bezzi, P. (2008). SDF 1-alpha (CXCL12) triggers glutamate exocytosis from astrocytes on a millisecond time scale: imaging analysis at the single-vesicle level with TIRF microscopy. *J Neuroimmunol* 198, 82-91.

Callaghan, R., Ford, R. C. and Kerr, I. D. (2006). The translocation mechanism of P-glycoprotein. *FEBS Lett* 580, 1056-63.

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

Carver, L. A. and Schnitzer, J. E. (2003). Caveolae: mining little caves for new cancer targets. *Nat Rev Cancer* 3, 571-81.

Caumont, A. S., Galas, M. C., Vitale, N., Aunis, D. and Bader, M. F. (1998). Regulated exocytosis in chromaffin cells. Translocation of ARF6 stimulates a plasma membrane-associated phospholipase D. *J Biol Chem* 273, 1373-9.

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

Chamberlain, L. H., Burgoyne, R. D. and Gould, G. W. (2001). SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 5619-24.

Chan, S. A. and Smith, C. (2003). Low frequency stimulation of mouse adrenal slices reveals a clathrin-independent, protein kinase C-mediated endocytic mechanism. *J Physiol* 553, 707-17.

Chapman, E. R. (2008). How does synaptotagmin trigger neurotransmitter release? *Annu Rev Biochem* 77, 615-41.

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., 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.

Chen, J. L., Fucini, R. V., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Stamnes, M. (2005). Coatamer-bound Cdc42 regulates dynein recruitment to COPI vesicles. *J Cell Biol* 169, 383-9.

Chen, P., Hwang, T. C. and Gillis, K. D. (2001). The relationship between cAMP, Ca(2)+, and transport of CFTR to the plasma membrane. *J Gen Physiol* 118, 135-44.

Chernomordik, L. V. and Kozlov, M. M. (2008). Mechanics of membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* 15, 675-83.

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

Colley, W. C., Sung, T. C., Roll, R., Jenco, J., Hammond, S. M., Altshuler, Y., Bar-Sagi, D., Morris, A. J. and Frohman, M. A. (1997). Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. *Curr Biol* 7, 191-201.

Collins, B. M., McCoy, A. J., Kent, H. M., Evans, P. R. and Owen, D. J. (2002). Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell* 109, 523-35.

Conner, S. D. and Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37-44.

Crivellato, E., Nico, B. and Ribatti, D. (2008). The chromaffin vesicle: advances in understanding the composition of a versatile, multifunctional secretory organelle. *Anatomical record (Hoboken, NJ : 2007)* 291, 1587-602.

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

da Costa, S. R., Okamoto, C. T. and Hamm-Alvarez, S. F. (2003). Actin microfilaments et al.--the many components, effectors and regulators of epithelial cell endocytosis. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 1359-83.

Damke, H., Binns, D. D., Ueda, H., Schmid, S. L. and Baba, T. (2001a). Dynamin GTPase domain mutants block endocytic vesicle formation at morphologically distinct stages. *Mol Biol Cell* 12, 2578-89.

Damke, H., Muhlberg, A. B., Sever, S., Sholly, S., Warnock, D. E. and Schmid, S. L. (2001b). Expression, purification, and functional assays for self-association of dynamin-1. *Meth Enzymol* 329, 447-57.

Danino, D. and Hinshaw, J. E. (2001). Dynamin family of mechanoenzymes. *Curr Opin Cell Biol* 13, 454-60.

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.

- Darios, F., Connell, E. and Davletov, B.** (2007). Phospholipases and fatty acid signalling in exocytosis. *J Physiol (Lond)* 585, 699-704.
- de Diego, A. M., Gandía, L. and García, A. G.** (2008). A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla. *Acta physiologica (Oxford, England)* 192, 287-301.
- de Toledo, M., Senic-Matuglia, F., Salamero, J., Uze, G., Comunale, F., Fort, P. and Blangy, A.** (2003). The GTP/GDP cycling of rho GTPase TCL is an essential regulator of the early endocytic pathway. *Mol Biol Cell* 14, 4846-56.
- DEL CASTILLO, J. and KATZ, B.** (1954). Action, and spontaneous release, of acetylcholine at an inexcitable nerve-muscle junction. *J Physiol (Lond)* 126, 27P.
- Demo, S. D., Masuda, E., Rossi, A. B., Thronset, B. T., Gerard, A. L., Chan, E. H., Armstrong, R. J., Fox, B. P., Lorens, J. B., Payan, D. G. et al.** (1999). Quantitative measurement of mast cell degranulation using a novel flow cytometric annexin-V binding assay. *Cytometry* 36, 340-8.
- Desnos, C., Huet, S., Fanget, I., Chapuis, C., Bottiger, C., Racine, V., Sibarita, J. B., Henry, J. P. and Darchen, F.** (2007). Myosin va mediates docking of secretory granules at the plasma membrane. *J Neurosci* 27, 10636-45.
- 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.
- Devaux, P. F. and Morris, R.** (2004). Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. *Traffic* 5, 241-6.
- Di Paolo, G. and De Camilli, P.** (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443, 651-7.
- Díaz-Flores, L., Gutiérrez, R., Varela, H., Valladares, F., Alvarez-Argüelles, H. and Borges, R.** (2008). Histogenesis and morphofunctional characteristics of chromaffin cells. *Acta physiologica (Oxford, England)* 192, 145-63.
- Dittie, A. S., Hajibagheri, N. and Tooze, S. A.** (1996). The AP-1 adaptor complex binds to immature secretory granules from PC12 cells, and is regulated by ADP-ribosylation factor. *J Cell Biol* 132, 523-36.
- Dittie, A. S., Thomas, L., Thomas, G. and Tooze, S. A.** (1997). Interaction of furin in immature secretory granules from neuroendocrine cells with the AP-1 adaptor complex is modulated by casein kinase II phosphorylation. *EMBO J* 16, 4859-70.
- Douglas, W. W. and Rubin, R. P.** (1961). The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J Physiol* 159, 40-57.
- Doussau, F., Gasman, S., Humeau, Y., Vitiello, F., Popoff, M., Boquet, P., Bader, M. F. and Poulain, B.** (2000). A Rho-related GTPase is involved in Ca(2+)-dependent neurotransmitter exocytosis. *J Biol Chem* 275, 7764-70.
- Dovas, A. and Couchman, J. R.** (2005). RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem J* 390, 1-9.
- Doxsey, S. J., Brodsky, F. M., Blank, G. S. and Helenius, A.** (1987). Inhibition of endocytosis by anti-clathrin antibodies. *Cell* 50, 453-63.
- Dransart, E., Olofsson, B. and Cherfils, J.** (2005). RhoGDIs revisited: novel roles in Rho regulation. *Traffic* 6, 957-66.
- 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.

Dumitrescu Pene, T., Rose, S. D., Lejen, T., Marcu, M. G. and Trifaro, J. M. (2005). Expression of various scinderin domains in chromaffin cells indicates that this protein acts as a molecular switch in the control of actin filament dynamics and exocytosis. *J Neurochem* 92, 780-9.

E

Eckert, L. B., Repasky, G. A., Ulku, A. S., McFall, A., Zhou, H., Sartor, C. I. and Der, C. J. (2004). Involvement of Ras activation in human breast cancer cell signaling, invasion, and anoikis. *Cancer Res* 64, 4585-92.

Elhamdani, A., Azizi, F. and Artalejo, C. R. (2006a). 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.

Elhamdani, A., Azizi, F., Solomaha, E., Palfrey, H. C. and Artalejo, C. R. (2006b). Two mechanistically distinct forms of endocytosis in adrenal chromaffin cells: Differential effects of SH3 domains and amphiphysin antagonism. *FEBS Lett* 580, 3263-9.

Ellis, S. and Mellor, H. (2000). Regulation of endocytic traffic by rho family GTPases. *Trends Cell Biol* 10, 85-8.

Engqvist-Goldstein, A. E. and Drubin, D. G. (2003). Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 287-332.

Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-35.

Evanko, D. (2005). Primer: spying on exocytosis with amperometry. *Nat Methods* 2, 650.

Exton, J. H. (1999). Regulation of phospholipase D. *Biochim Biophys Acta* 1439, 121-33.

F

Fauchereau, F., Herbrand, U., Chafey, P., Eberth, A., Koulakoff, A., Vinet, M. C., Ahmadian, M. R., Chelly, J. and Billuart, P. (2003). The RhoGAP activity of OPHN1, a new F-actin-binding protein, is negatively controlled by its amino-terminal domain. *Mol Cell Neurosci* 23, 574-86.

Faundez, V., Horng, J. T. and Kelly, R. B. (1997). ADP ribosylation factor 1 is required for synaptic vesicle budding in PC12 cells. *J Cell Biol* 138, 505-15.

Feig, L. A. (1999). Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nat Cell Biol* 1, E25-7.

Felmy, F. (2008). Actin and dynamin recruitment and the lack thereof at exo- and endocytotic sites in PC12 cells. *Pflugers Arch*.

Ferraro, F., Ma, X. M., Sobota, J. A., Eipper, B. A. and Mains, R. E. (2007). Kalirin/Trio Rho guanine nucleotide exchange factors regulate a novel step in secretory granule maturation. *Mol Biol Cell* 18, 4813-25.

Ferro-Novick, S. and Jahn, R. (1994). Vesicle fusion from yeast to man. *Nature* 370, 191-3.

Fleming, I. N., Batty, I. H., Prescott, A. R., Gray, A., Kular, G. S., Stewart, H. and Downes, C. P. (2004). Inositol phospholipids regulate the guanine-nucleotide-exchange factor Tiam1 by facilitating its binding to the plasma membrane and regulating GDP/GTP exchange on Rac1. *Biochem J* 382, 857-65.

Frantz, C., Coppola, T. and Regazzi, R. (2002). Involvement of Rho GTPases and their effectors in the secretory process of PC12 cells. *Exp Cell Res* 273, 119-26.

Frodin, M. and Gammeltoft, S. (1999). Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol* 151, 65-77.

Fulop, T., Radabaugh, S. and Smith, C. (2005). Activity-dependent differential transmitter release in mouse adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* 25, 7324-32.

Fulop, T. and Smith, C. (2006). Physiological stimulation regulates the exocytic mode through calcium activation of protein kinase C in mouse chromaffin cells. *Biochem J* 399, 111-9.

Fulop, T. and Smith, C. (2007). Matching native electrical stimulation by graded chemical stimulation in isolated mouse adrenal chromaffin cells. *J Neurosci Methods* 166, 195-202.

G

Gaidarov, I. and Keen, J. H. (1999). Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits. *J Cell Biol* 146, 755-64.

Galas, M. C., Chasserot-Golaz, S., Dirrig-Grosch, S. and Bader, M. F. (2000). Presence of dynamin--syntaxin complexes associated with secretory granules in adrenal chromaffin cells. *J Neurochem* 75, 1511-9.

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

Gampel, A., Parker, P. J. and Mellor, H. (1999). Regulation of epidermal growth factor receptor traffic by the small GTPase rhoB. *Curr Biol* 9, 955-8.

Gandhi, S. P. and Stevens, C. F. (2003). Three modes of synaptic vesicular recycling revealed by single-vesicle imaging. *Nature* 423, 607-13.

Gao, Y. S., Hubbert, C. C., Lu, J., Lee, Y. S., Lee, J. Y. and Yao, T. P. (2007). Histone deacetylase 6 regulates growth factor-induced actin remodeling and endocytosis. *Mol Cell Biol* 27, 8637-47.

García, A. G., García-De-Diego, A. M., Gandía, L., Borges, R. and García-Sancho, J. (2006). Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev* 86, 1093-131.

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., Hubert, P., Aunis, D. and Bader, M. F. (1998). Identification of a potential effector pathway for the trimeric Go protein associated with secretory granules. Go stimulates a granule-bound phosphatidylinositol 4-kinase by activating RhoA in chromaffin cells. *J Biol Chem* 273, 16913-20.

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.

Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., Popoff, M. R., Aunis, D. and Bader, M. F. (1997). Trimeric G proteins control exocytosis in chromaffin cells. Go regulates the peripheral actin network and catecholamine secretion by a mechanism involving the small GTP-binding protein Rho. *J Biol Chem* 272, 20564-71.

Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., Popoff, M. R., Aunis, D. and Bader, M. F. (1999a). Involvement of Rho GTPases in calcium-regulated exocytosis from adrenal chromaffin cells. *J Cell Sci* 112 (Pt 24), 4763-71.

Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., Vitale, N. and Bader, M. F. (1999b). [Bacterial toxins: useful for studying G-proteins implicated in the mechanism of exocytosis in neuroendocrine cells]. *J Soc Biol* 193, 451-6.

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

Gil, A., Rueda, J., Viniegra, S. and Gutierrez, L. M. (2000). The F-actin cytoskeleton modulates slow secretory components rather than readily releasable vesicle pools in bovine chromaffin cells. *Neuroscience* 98, 605-14.

Giner, D., López, I., Villanueva, J., Torres, V., Viniegra, S. and Gutiérrez, L. M. (2007). Vesicle movements are governed by the size and dynamics of F-actin cytoskeletal structures in bovine chromaffin cells. *Neuroscience* 146, 659-69.

Giner, D., Neco, P., Frances Mdel, M., Lopez, I., Viniegra, S. and Gutierrez, L. M. (2005). Real-time dynamics of the F-actin cytoskeleton during secretion from chromaffin cells. *J Cell Sci* 118, 2871-80.

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.

Granseth, B., Odermatt, B., Royle, S. J. and Lagnado, L. (2006). Clathrin-mediated endocytosis is the dominant mechanism of vesicle retrieval at hippocampal synapses. *Neuron* 51, 773-86.

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 USA* 73, 2424-8.

Guipponi, M., Scott, H. S., Chen, H., Schebesta, A., Rossier, C. and Antonarakis, S. E. (1998). Two isoforms of a human intersectin (ITSN) protein are produced by brain-specific alternative splicing in a stop codon. *Genomics* 53, 369-76.

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.

H

Hall, A. B., Gakidis, M. A., Glogauer, M., Wilsbacher, J. L., Gao, S., Swat, W. and Brugge, J. S. (2006). Requirements for Vav guanine nucleotide exchange factors and Rho GTPases in FcγR- and complement-mediated phagocytosis. *Immunity* 24, 305-16.

Hammond, S. M., Jenco, J. M., Nakashima, S., Cadwallader, K., Gu, Q., Cook, S., Nozawa, Y., Prestwich, G. D., Frohman, M. A. and Morris, A. J. (1997). Characterization of two alternately spliced forms of phospholipase D1. Activation of the purified enzymes by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, ADP-ribosylation factor, and Rho family monomeric GTP-binding proteins and protein kinase C-α. *J Biol Chem* 272, 3860-8.

Han, X. and Jackson, M. B. (2006). Structural transitions in the synaptic SNARE complex during Ca²⁺-triggered exocytosis. *J Cell Biol* 172, 281-93.

Harata, N. C., Aravanis, A. M. and Tsien, R. W. (2006a). Kiss-and-run and full-collapse fusion as modes of exo-endocytosis in neurosecretion. *J Neurochem* 97, 1546-70.

Harata, N. C., Choi, S., Pyle, J. L., Aravanis, A. M. and Tsien, R. W. (2006b). Frequency-dependent kinetics and prevalence of kiss-and-run and reuse at hippocampal synapses studied with novel quenching methods. *Neuron* 49, 243-56.

Haucke, V. and Di Paolo, G. (2007). Lipids and lipid modifications in the regulation of membrane traffic. *Curr Opin Cell Biol* 19, 426-35.

He, L., Wu, X. S., Mohan, R. and Wu, L. G. (2006). Two modes of fusion pore opening revealed by cell-attached recordings at a synapse. *Nature* 444, 102-5.

Heasman, S. J. and Ridley, A. J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 690-701.

Heuser, J. E. and Reese, T. S. (1973). Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* 57, 315-44.

Hiesinger, P. R., Fayyazuddin, A., Mehta, S. Q., Rosenmund, T., Schulze, K. L., Zhai, R. G., Verstreken, P., Cao, Y., Zhou, Y., Kunz, J. et al. (2005). The v-ATPase V0 subunit a1 is required for a late step in synaptic vesicle exocytosis in *Drosophila*. *Cell* 121, 607-20.

Hodgkin, M. N., Clark, J. M., Rose, S., Saqib, K. and Wakelam, M. J. (1999). Characterization of the regulation of phospholipase D activity in the detergent-insoluble fraction of HL60 cells by protein kinase C and small G-proteins. *Biochem J* 339 (Pt 1), 87-93.

Hong-Geller, E. and Cerione, R. A. (2000). Cdc42 and Rac stimulate exocytosis of secretory granules by activating the IP(3)/calcium pathway in RBL-2H3 mast cells. *J Cell Biol* 148, 481-94.

Hook, V. and Metz-Boutigue, M. H. (2002). Protein trafficking to chromaffin granules and proteolytic processing within regulated secretory vesicles of neuroendocrine chromaffin cells. *Ann N Y Acad Sci* 971, 397-405.

Hsu, S. C., TerBush, D., Abraham, M. and Guo, W. (2004). The exocyst complex in polarized exocytosis. *Int Rev Cytol* 233, 243-65.

Humeau, Y., Gambino, F., Chelly, J. and Vitale, N. (2009). X-linked mental retardation: focus on synaptic function and plasticity. *J Neurochem*.

Humeau, Y., Popoff, M. R., Kojima, H., Doussau, F. and Poulain, B. (2002). Rac GTPase plays an essential role in exocytosis by controlling the fusion competence of release sites. *J Neurosci* 22, 7968-81.

Humeau, Y., Vitale, N., Chasserot-Golaz, S., Dupont, J. L., Du, G., Frohman, M. A., Bader, M. F. and Poulain, B. (2001). A role for phospholipase D1 in neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 15300-5.

Hussain, N. K., Jenna, S., Glogauer, M., Quinn, C. C., Wasiak, S., Guipponi, M., Antonarakis, S. E., Kay, B. K., Stossel, T. P., Lamarche-Vane, N. et al. (2001). Endocytic protein intersectin-1 regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP. *Nat Cell Biol* 3, 927-32.

Hussain, N. K., Yamabhai, M., Ramjaun, A. R., Guy, A. M., Baranes, D., O'Bryan, J. P., Der, C. J., Kay, B. K. and McPherson, P. S. (1999). Splice variants of intersectin are components of the endocytic machinery in neurons and nonneuronal cells. *J Biol Chem* 274, 15671-7.

I

Idelman, S., Verdetti, J. (2000). Endocrinologie et communications cellulaires. Collection Grenoble Science.

Ikeda, M., Kihara, A. and Igarashi, Y. (2006). Lipid asymmetry of the eukaryotic plasma membrane: functions and related enzymes. *Biol Pharm Bull* 29, 1542-6.

Irie, F. and Yamaguchi, Y. (2002). EphB receptors regulate dendritic spine development via intersectin, Cdc42 and N-WASP. *Nat Neurosci* 5, 1117-8.

Itakura, M., Misawa, H., Sekiguchi, M., Takahashi, S. and Takahashi, M. (1999). Transfection analysis of functional roles of complexin I and II in the exocytosis of two different types of secretory vesicles. *Biochem Biophys Res Commun* 265, 691-6.

Ivanova, P. T., Milne, S. B., Forrester, J. S. and Brown, H. A. (2004). LIPID arrays: new tools in the understanding of membrane dynamics and lipid signaling. *Mol Interv* 4, 86-96.

J

Jackson, M. B. (2007). In search of the fusion pore of exocytosis. *Biophys Chem* 126, 201-8.

Jackson, M. B. and Chapman, E. R. (2008). The fusion pores of Ca²⁺-triggered exocytosis. *Nat Struct Mol Biol* 15, 684-689.

Jaffe, A. B. and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 247-69.

Jahn, R., Lang, T. and Sudhof, T. C. (2003). Membrane fusion. *Cell* 112, 519-33.

Jahn, R. and Scheller, R. H. (2006). SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 631-43.

James, D. J., Khodthong, C., Kowalchuk, J. A. and Martin, T. F. (2008). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates SNARE-dependent membrane fusion. *J Cell Biol* 182, 355-66.

Jena, B. P., Cho, S. J., Jeremic, A., Stromer, M. H. and Abu-Hamdah, R. (2003). Structure and composition of the fusion pore. *Biophys J* 84, 1337-43.

Jenkins, G. M. and Frohman, M. A. (2005). Phospholipase D: a lipid centric review. *Cell Mol Life Sci* 62, 2305-16.

Jenna, S., Hussain, N. K., Danek, E. I., Triki, I., Wasiak, S., McPherson, P. S. and Lamarche-Vane, N. (2002). The activity of the GTPase-activating protein CdGAP is regulated by the endocytic protein intersectin. *J Biol Chem* 277, 6366-73.

Jiang, Z. Y., Chawla, A., Bose, A., Way, M. and Czech, M. P. (2002). A phosphatidylinositol 3-kinase-independent insulin signaling pathway to N-WASP/Arp2/3/F-actin required for GLUT4 glucose transporter recycling. *J Biol Chem* 277, 509-15.

Johns, L. M., Levitan, E. S., Shelden, E. A., Holz, R. W. and Axelrod, D. (2001). Restriction of secretory granule motion near the plasma membrane of chromaffin cells. *J Cell Biol* 153, 177-90.

Jones, D. H., Morris, J. B., Morgan, C. P., Kondo, H., Irvine, R. F. and Cockcroft, S. (2000). Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase directly interacts with ADP-ribosylation factor 1 and is responsible for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis in the golgi compartment. *J Biol Chem* 275, 13962-6.

Jordens, I., Marsman, M., Kuijl, C. and Neefjes, J. (2005). Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic* 6, 1070-7.

Jorgensen, E. M., Hartwig, E., Schuske, K., Nonet, M. L., Jin, Y. and Horvitz, H. R. (1995). Defective recycling of synaptic vesicles in synaptotagmin mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 378, 196-9.

Jung, N., Wienisch, M., Gu, M., Rand, J. B., Muller, S. L., Krause, G., Jorgensen, E. M., Klingauf, J. and Haucke, V. (2007). Molecular basis of synaptic vesicle cargo recognition by the endocytic sorting adaptor stonin 2. *J Cell Biol* 179, 1497-510.

K

Kaneko, T., Li, L. and Li, S. S. (2008). The SH3 domain--a family of versatile peptide- and protein-recognition module. *Front Biosci* 13, 4938-52.

Kaneko, T., Maeda, A., Takefuji, M., Aoyama, H., Nakayama, M., Kawabata, S., Kawano, Y., Iwamatsu, A., Amano, M. and Kaibuchi, K. (2005). Rho mediates endocytosis of epidermal growth factor receptor through phosphorylation of endophilin A1 by Rho-kinase. *Genes Cells* 10, 973-87.

Kasson, P. M. and Pande, V. S. (2007). Control of membrane fusion mechanism by lipid composition: predictions from ensemble molecular dynamics. *PLoS Comput Biol* 3, e220.

Kato, N., Nakanishi, M. and Hirashima, N. (2002). Transbilayer asymmetry of phospholipids in the plasma membrane regulates exocytotic release in mast cells. *Biochemistry* 41, 8068-74.

Kesavapany, S., Amin, N., Zheng, Y. L., Nijhara, R., Jaffe, H., Sihag, R., Gutkind, J. S., Takahashi, S., Kulkarni, A., Grant, P. et al. (2004). p35/cyclin-dependent kinase 5 phosphorylation of ras guanine nucleotide releasing factor 2 (RasGRF2) mediates Rac-dependent Extracellular Signal-regulated kinase 1/2 activity, altering RasGRF2 and microtubule-associated protein 1b distribution in neurons. *J Neurosci* 24, 4421-31.

Kim, T., Gondré-Lewis, M. C., Arnaoutova, I. and Loh, Y. P. (2006). Dense-core secretory granule biogenesis. *Physiology (Bethesda, Md)* 21, 124-33.

Kim, T., Zhang, C. F., Sun, Z., Wu, H. and Loh, Y. P. (2005). Chromogranin A deficiency in transgenic mice leads to aberrant chromaffin granule biogenesis. *J Neurosci* 25, 6958-61.

Kim, W. T., Chang, S., Daniell, L., Cremona, O., Di Paolo, G. and De Camilli, P. (2002). Delayed reentry of recycling vesicles into the fusion-competent synaptic vesicle pool in synaptojanin 1 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 17143-8.

Kiyono, M., Kaziro, Y. and Satoh, T. (2000). Induction of rac-guanine nucleotide exchange activity of Ras-GRF1/CDC25(Mm) following phosphorylation by the nonreceptor tyrosine kinase Src. *J Biol Chem* 275, 5441-6.

Klyachko, V. A. and Jackson, M. B. (2002). Capacitance steps and fusion pores of small and large-dense-core vesicles in nerve terminals. *Nature* 418, 89-92.

Kowluru, A., Li, G., Rabaglia, M. E., Segu, V. B., Hofmann, F., Aktories, K. and Metz, S. A. (1997). Evidence for differential roles of the Rho subfamily of GTP-binding proteins in glucose- and calcium-induced insulin secretion from pancreatic beta cells. *Biochem Pharmacol* 54, 1097-108.

Kozlovsky, Y., Chernomordik, L. V. and Kozlov, M. M. (2002). Lipid intermediates in membrane fusion: formation, structure, and decay of hemifusion diaphragm. *Biophys J* 83, 2634-51.

Ktistakis, N. T., Delon, C., Manifava, M., Wood, E., Ganley, I. and Sugars, J. M. (2003). Phospholipase D1 and potential targets of its hydrolysis product, phosphatidic acid. *Biochem Soc Trans* 31, 94-7.

L

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.

Lam, A. D., Tryoen-Toth, P., Tsai, B., Vitale, N. and Stuenkel, E. L. (2008). SNARE-catalyzed fusion events are regulated by Syntaxin1A-lipid interactions. *Mol Biol Cell* 19, 485-97.

- Lamaze, C., Chuang, T. H., Terlecky, L. J., Bokoch, G. M. and Schmid, S. L.** (1996). Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac. *Nature* 382, 177-9.
- Lamaze, C., Dujancourt, 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.
- Lamaze, C., Fujimoto, L. M., Yin, H. L. and Schmid, S. L.** (1997). The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *J Biol Chem* 272, 20332-5.
- 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., 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.
- Laux, T., Fukami, K., Thelen, M., Golub, T., Frey, D. and Caroni, P.** (2000). GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism. *J Cell Biol* 149, 1455-72.
- Lee, C. S., Kim, I. S., Park, J. B., Lee, M. N., Lee, H. Y., Suh, P. G. and Ryu, S. H.** (2006). The phox homology domain of phospholipase D activates dynamin GTPase activity and accelerates EGFR endocytosis. *Nat Cell Biol* 8, 477-84.
- Lee, D., Hirashima, N. and Kirino, Y.** (2000). Rapid transbilayer phospholipid redistribution associated with exocytotic release of neurotransmitters from cholinergic nerve terminals isolated from electric ray *Narke japonica*. *Neurosci Lett* 291, 21-4.
- Li, H. Y., Cao, K. and Zheng, Y.** (2003a). Ran in the spindle checkpoint: a new function for a versatile GTPase. *Trends Cell Biol* 13, 553-7.
- Li, Q., Ho, C. S., Marinescu, V., Bhatti, H., Bokoch, G. M., Ernst, S. A., Holz, R. W. and Stuenkel, E. L.** (2003b). Facilitation of Ca(2+)-dependent exocytosis by Rac1-GTPase in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 550, 431-45.
- Ligeti, E., Dagher, M. C., Hernandez, S. E., Koleske, A. J. and Settleman, J.** (2004). Phospholipids can switch the GTPase substrate preference of a GTPase-activating protein. *J Biol Chem* 279, 5055-8.
- Lipschutz, J. H. and Mostov, K. E.** (2002). Exocytosis: the many masters of the exocyst. *Curr Biol* 12, R212-4.
- Liu, J. P., Zhang, Q. X., Baldwin, G. and Robinson, P. J.** (1996). Calcium binds dynamin I and inhibits its GTPase activity. *J Neurochem* 66, 2074-81.
- Llobet, A., Beaumont, V. and Lagnado, L.** (2003). Real-time measurement of exocytosis and endocytosis using interference of light. *Neuron* 40, 1075-86.
- Llobet, A., Wu, M. and Lagnado, L.** (2008). The mouth of a dense-core vesicle opens and closes in a concerted action regulated by calcium and amphiphysin. *J Cell Biol* 182, 1017-28.
- Lollike, K. and Lindau, M.** (1999). Membrane capacitance techniques to monitor granule exocytosis in neutrophils. *J Immunol Methods* 232, 111-20.
- 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.
- Luna, A., Matas, O. B., Martinez-Menarguez, J. A., Mato, E., Duran, J. M., Ballesta, J., Way, M. and Egea, G.** (2002). Regulation of protein transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum by CDC42 and N-WASP. *Mol Biol Cell* 13, 866-79.

M

- Macia, E., Ehrlich, M., Massol, R., Boucrot, E., Brunner, C. and Kirchhausen, T.** (2006). Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell* 10, 839-50.
- Madaule, P. and Axel, R.** (1985). A novel ras-related gene family. *Cell* 41, 31-40.
- Malacombe, M., Bader, M. F. and Gasman, S.** (2006a). Exocytosis in neuroendocrine cells: new tasks for actin. *Biochim Biophys Acta* 1763, 1175-83.
- Malacombe, M., Ceridono, M., Calco, V., Chasserot-Golaz, S., McPherson, P. S., Bader, M. F. and Gasman, S.** (2006b). Intersectin-1L nucleotide exchange factor regulates secretory granule exocytosis by activating Cdc42. *EMBO J* 25, 3494-503.
- Malcolm, K. C., Elliott, C. M. and Exton, J. H.** (1996). Evidence for Rho-mediated agonist stimulation of phospholipase D in rat1 fibroblasts. Effects of Clostridium botulinum C3 exoenzyme. *J Biol Chem* 271, 13135-9.
- Malecz, N., McCabe, P. C., Spaargaren, C., Qiu, R., Chuang, Y. and Symons, M.** (2000). Synaptojanin 2, a novel Rac1 effector that regulates clathrin-mediated endocytosis. *Curr Biol* 10, 1383-6.
- Malsam, J., Kreye, S. and Söllner, T. H.** (2008). Membrane fusion: SNAREs and regulation. *Cell Mol Life Sci* 65, 2814-32.
- Mani, M., Lee, S. Y., Lucast, L., Cremona, O., Di Paolo, G., De Camilli, P. and Ryan, T. A.** (2007). The dual phosphatase activity of synaptojanin1 is required for both efficient synaptic vesicle endocytosis and reavailability at nerve terminals. *Neuron* 56, 1004-18.
- Manser, E., Loo, T. H., Koh, C. G., Zhao, Z. S., Chen, X. Q., Tan, L., Tan, I., Leung, T. and Lim, L.** (1998). PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Mol Cell* 1, 183-92.
- Marqueze, B., Berton, F. and Seagar, M.** (2000). Synaptotagmins in membrane traffic: which vesicles do the tagmins tag? *Biochimie* 82, 409-20.
- Matter, K., Dreyer, F. and Aktories, K.** (1989). Actin involvement in exocytosis from PC12 cells: studies on the influence of botulinum C2 toxin on stimulated noradrenaline release. *J Neurochem* 52, 370-6.
- Mayor, S. and Pagano, R. E.** (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 603-12.
- McDermott, M., Wakelam, M. J. and Morris, A. J.** (2004). Phospholipase D. *Biochem Cell Biol* 82, 225-53.
- McLaughlin, S. and Murray, D.** (2005). Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature* 438, 605-11.
- Meller, N., Merlot, S. and Guda, C.** (2005). CZH proteins: a new family of Rho-GEFs. *J Cell Sci* 118, 4937-46.
- Merrifield, C. J., Perrais, D. and Zenisek, D.** (2005). Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells. *Cell* 121, 593-606.
- Merrifield, C. J., Qualmann, B., Kessels, M. M. and Almers, W.** (2004). Neural Wiskott Aldrich Syndrome Protein (N-WASP) and the Arp2/3 complex are recruited to sites of clathrin-mediated endocytosis in cultured fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 83, 13-8.
- Meunier, F. A., Osborne, S. L., Hammond, G. R., Cooke, F. T., Parker, P. J., Domin, J. and Schiavo, G.** (2005). Phosphatidylinositol 3-kinase C2alpha is essential for ATP-dependent priming of neurosecretory granule exocytosis. *Mol Biol Cell* 16, 4841-51.
- 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.

Milosevic, I., Sørensen, J. B., Lang, T., Krauss, M., Nagy, G., Haucke, V., Jahn, R. and Neher, E. (2005). Plasmalemmal phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate level regulates the releasable vesicle pool size in chromaffin cells. *J Neurosci* 25, 2557-65.

Min, L., Leung, Y. M., Tomas, A., Watson, R. T., Gaisano, H. Y., Halban, P. A., Pessin, J. E. and Hou, J. C. (2007). Dynamin is functionally coupled to insulin granule exocytosis. *J Biol Chem* 282, 33530-6.

Miyamoto, S., Funatsu, T., Ishiwata, S. and Fujime, S. (1993). Changes in mobility of chromaffin granules in actin network with its assembly and Ca(2+)-dependent disassembly by gelsolin. *Biophys J* 64, 1139-49.

Montero, M., Alonso, M. T., Carnicero, E., Cuchillo-Ibanez, I., Albillos, A., Garcia, A. G., Garcia-Sancho, J. and Alvarez, J. (2000). Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol* 2, 57-61.

Montero-Hadjadje, M., Elias, S., Chevalier, L., Benard, M., Tanguy, Y., Turquier, V., Galas, L., Yon, L., Malagon, M. M., Driouich, A. et al. (2009). Chromogranin a promotes peptide hormone sorting to mobile granules in constitutively and regulated secreting cells: Role of conserved N- and C-terminal peptides. *J Biol Chem*.

Moon, S. Y. and Zheng, Y. (2003). Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol* 13, 13-22.

Moritz, A., De Graan, P. N., Gispen, W. H. and Wirtz, K. W. (1992). Phosphatidic acid is a specific activator of phosphatidylinositol-4-phosphate kinase. *J Biol Chem* 267, 7207-10.

Morone, N., Fujiwara, T., Murase, K., Kasai, R. S., Ike, H., Yuasa, S., Usukura, J. and Kusumi, A. (2006). Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. *J Cell Biol* 174, 851-62.

Morvan, J. and Tooze, S. A. (2008). Discovery and progress in our understanding of the regulated secretory pathway in neuroendocrine cells. *Histochem Cell Biol* 129, 243-52.

Moser, T. and Neher, E. (1997). Estimation of mean exocytic vesicle capacitance in mouse adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6735-40.

Moskalenko, S., Henry, D. O., Rosse, C., Mirey, G., Camonis, J. H. and White, M. A. (2002). The exocyst is a Ral effector complex. *Nat Cell Biol* 4, 66-72.

Motley, A., Bright, N. A., Seaman, M. N. and Robinson, M. S. (2003). Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J Cell Biol* 162, 909-18.

Mousavi, S. A., Malerod, L., Berg, T. and Kjekens, R. (2004). Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J* 377, 1-16.

N

Nakata, T. and Hirokawa, N. (1992). Organization of cortical cytoskeleton of cultured chromaffin cells and involvement in secretion as revealed by quick-freeze, deep-etching, and double-label immunoelectron microscopy. *J Neurosci* 12, 2186-97.

Nanjundan, M., Sun, J., Zhao, J., Zhou, Q., Sims, P. J. and Wiedmer, T. (2003). Plasma membrane phospholipid scramblase 1 promotes EGF-dependent activation of c-Src through the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 278, 37413-8.

Ndebele, K., Gona, P., Jin, T. G., Benhaga, N., Chalah, A., Degli-Esposti, M. and Khosravi-Far, R. (2008). Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induced mitochondrial pathway to apoptosis and caspase activation is potentiated by phospholipid scramblase-3. *Apoptosis* 13, 845-56.

Neco, P., Fernandez-Peruchena, C., Navas, S., Gutierrez, L. M., de Toledo, G. A. and Ales, E. (2008). Myosin II contributes to fusion pore expansion during exocytosis. *J Biol Chem* 283, 10949-57.

Neco, P., Giner, D., del Mar Francés, M., Viniegra, S. and Gutiérrez, 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.

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

Nobes, C. D. and Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62.

O

Okamoto, M., Schoch, S. and Sudhof, T. C. (1999). ESH1/intersectin, a protein that contains EH and SH3 domains and binds to dynamin and SNAP-25. A protein connection between exocytosis and endocytosis? *J Biol Chem* 274, 18446-54.

Osmani, N., Vitale, N., Borg, J. P. and Etienne-Manneville, S. (2006). Scrib Controls Cdc42 Localization and Activity to Promote Cell Polarization during Astrocyte Migration. *Curr Biol*.

Oude Weernink, P. A., Schulte, P., Guo, Y., Wetzel, J., Amano, M., Kaibuchi, K., Haverland, S., Voss, M., Schmidt, M., Mayr, G. W. et al. (2000). Stimulation of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase by Rho-kinase. *J Biol Chem* 275, 10168-74.

Owen, D. J., Collins, B. M. and Evans, P. R. (2004). Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 153-91.

Owen, D. J., Vallis, Y., Pearse, B. M., McMahon, H. T. and Evans, P. R. (2000). The structure and function of the beta 2-adaptin appendage domain. *EMBO J* 19, 4216-27.

P

Paillart, C., Li, J., Matthews, G. and Sterling, P. (2003). Endocytosis and vesicle recycling at a ribbon synapse. *J Neurosci* 23, 4092-9.

Parkar, N., Akpa, B. S., Nitsche, L. C., Wedgewood, L. E., Sverdllov, M. S., Place, A. T., Chaga, O. and Minshall, R. D. (2008). Vesicle Formation and Endocytosis: Function, Machinery, Mechanisms, and Modeling. *Antioxid Redox Signal*.

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.

Patzak, A., Bock, G., Fischer-Colbrie, R., Schauenstein, K., Schmidt, W., Lingg, G. and Winkler, H. (1984). Exocytotic exposure and retrieval of membrane antigens of chromaffin granules: quantitative evaluation of immunofluorescence on the surface of chromaffin cells. *J Cell Biol* 98, 1817-24.

Patzak, A. and Winkler, H. (1986). Exocytotic exposure and recycling of membrane antigens of chromaffin granules: ultrastructural evaluation after immunolabeling. *J Cell Biol* 102, 510-5.

Perrais, D., Kleppe, I. C., Taraska, J. W. and Almers, W. (2004). Recapture after exocytosis causes differential retention of protein in granules of bovine chromaffin cells. *J Physiol (Lond)* 560, 413-28.

Perrais, D. and Merrifield, C. J. (2005). Dynamics of endocytic vesicle creation. *Dev Cell* 9, 581-92.

Peters, C., Bayer, M. J., Buhler, S., Andersen, J. S., Mann, M. and Mayer, A. (2001). Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature* 409, 581-8.

Phillips, J. H., Burrridge, K., Wilson, S. P. and Kirshner, N. (1983). Visualization of the exocytosis/endocytosis secretory cycle in cultured adrenal chromaffin cells. *J Cell Biol* 97, 1906-17.

Pike, L. J. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res* 47, 1597-8.

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.

Pomorski, T., Herrmann, A., Zachowski, A., Devaux, P. F. and Muller, P. (1994). Rapid determination of the transbilayer distribution of NBD-phospholipids in erythrocyte membranes with dithionite. *Mol Membr Biol* 11, 39-44.

Powell, K. A., Valova, V. A., Malladi, C. S., Jensen, O. N., Larsen, M. R. and Robinson, P. J. (2000). Phosphorylation of dynamin I on Ser-795 by protein kinase C blocks its association with phospholipids. *J Biol Chem* 275, 11610-7.

Praefcke, G. J. and McMahon, H. T. (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 133-47.

Pucadyil, T. J. and Schmid, S. L. (2008). Real-time visualization of dynamin-catalyzed membrane fission and vesicle release. *Cell* 135, 1263-75.

Q

Qualmann, B. and Mellor, H. (2003). Regulation of endocytic traffic by Rho GTPases. *Biochem J* 371, 233-41.

R

Ren, G., Vajjhala, P., Lee, J. S., Winsor, B. and Munn, A. L. (2006). The BAR domain proteins: molding membranes in fission, fusion, and phagy. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 37-120.

Ren, X. D., Bokoch, G. M., Traynor-Kaplan, A., Jenkins, G. H., Anderson, R. A. and Schwartz, M. A. (1996). Physical association of the small GTPase Rho with a 68-kDa phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in Swiss 3T3 cells. *Mol Biol Cell* 7, 435-42.

Ridley, A. J. (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol* 16, 522-9.

Ridley, A. J. and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389-99.

Riento, K., Guasch, R. M., Garg, R., Jin, B. and Ridley, A. J. (2003). RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Mol Cell Biol* 23, 4219-29.

Rizzoli, S. O. and Betz, W. J. (2005). Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci* 6, 57-69.

Rizzoli, S. O. and Jahn, R. (2007). Kiss-and-run, collapse and 'readily retrievable' vesicles. *Traffic* 8, 1137-44.

Robbe, K., Otto-Bruc, A., Chardin, P. and Antonny, B. (2003). Dissociation of GDP dissociation inhibitor and membrane translocation are required for efficient activation of Rac by the Dbl homology-pleckstrin homology region of Tiam. *J Biol Chem* 278, 4756-62.

Rohde, G., Wenzel, D. and Haucke, V. (2002). A phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding site within mu2-adaptin regulates clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 158, 209-14.

Rose, S., Lejen, T., Casaletti, L., Larson, R. E., Pene, T. D. and Trifaro, J. M. (2003). Myosins II and V in chromaffin cells: myosin V is a chromaffin vesicle molecular motor involved in secretion. *J Neurochem* 85, 287-98.

Rose, S., Malabarba, M. G., Krag, C., Schultz, A., Tsushima, H., Di Fiore, P. P. and Salcini, A. E. (2007). Caenorhabditis elegans intersectin: a synaptic protein regulating neurotransmission. *Mol Biol Cell* 18, 5091-9.

Rossmann, K. L. and Campbell, S. L. (2000). Bacterial expressed DH and DH/PH domains. *Methods Enzymol* 325, 25-38.

Roth, M. G. (2008). Molecular mechanisms of PLD function in membrane traffic. *Traffic* 9, 1233-9.

Roth, T. F. and Porter, K. R. (1964). Yolk Protein Uptake in the Oocyte of the Mosquito Aedes Aegypti. L. *J Cell Biol* 20, 313-32.

Roux, A., Uyhazi, K., Frost, A. and De Camilli, P. (2006). GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature* 441, 528-31.

Rudolf, R., Kogel, T., Kuznetsov, S. A., Salm, T., Schlicker, O., Hellwig, A., Hammer, J. A. 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.

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.

Russo, C., Gao, Y., Mancini, P., Vanni, C., Porotto, M., Falasca, M., Torrisi, M. R., Zheng, Y. and Eva, A. (2001). Modulation of oncogenic DBL activity by phosphoinositol phosphate binding to pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* 276, 19524-31.

Ryan, T. A. (2003). Kiss-and-run, fuse-pinch-and-linger, fuse-and-collapse: the life and times of a neurosecretory granule. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 2171-3.

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.

Sahu, S. K., Gummadi, S. N., Manoj, N. and Aradhyam, G. K. (2007). Phospholipid scramblases: an overview. *Arch Biochem Biophys* 462, 103-14.

Sandvig, K., Torgersen, M. L., Raa, H. A. and van Deurs, B. (2008). Clathrin-independent endocytosis: from nonexistent to an extreme degree of complexity. *Histochem Cell Biol* 129, 267-76.

Sankaranarayanan, S. and Ryan, T. A. (2000). Real-time measurements of vesicle-SNARE recycling in synapses of the central nervous system. *Nat Cell Biol* 2, 197-204.

Santy, L. C. and Casanova, J. E. (2001). Activation of ARF6 by ARNO stimulates epithelial cell migration through downstream activation of both Rac1 and phospholipase D. *J Cell Biol* 154, 599-610.

Schaub, J. R., Lu, X., Doneske, B., Shin, Y. K. and McNew, J. A. (2006). Hemifusion arrest by complexin is relieved by Ca²⁺-synaptotagmin I. *Nat Struct Mol Biol* 13, 748-50.

Schmid, E. M. and McMahon, H. T. (2007). Integrating molecular and network biology to decode endocytosis. *Nature* 448, 883-8.

- Schmidt, A. and Hall, A.** (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16, 1587-609.
- Schober, M., Raghavan, S., Nikolova, M., Polak, L., Pasolli, H. A., Beggs, H. E., Reichardt, L. F. and Fuchs, E.** (2007). Focal adhesion kinase modulates tension signaling to control actin and focal adhesion dynamics. *J Cell Biol* 176, 667-80.
- 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.
- Shih, F. Y. and Wu, Y. T.** (2004). The efficient algorithms for achieving Euclidean distance transformation. *IEEE Trans Image Process* 13, 1078-91.
- Shin, E. Y., Lee, C. S., Cho, T. G., Kim, Y. G., Song, S., Juhn, Y. S., Park, S. C., Manser, E. and Kim, E. G.** (2006). betaPak-interacting exchange factor-mediated Rac1 activation requires smgGDS guanine nucleotide exchange factor in basic fibroblast growth factor-induced neurite outgrowth. *J Biol Chem* 281, 35954-64.
- Shin, E. Y., Shin, K. S., Lee, C. S., Woo, K. N., Quan, S. H., Soung, N. K., Kim, Y. G., Cha, C. I., Kim, S. R., Park, D. et al.** (2002). Phosphorylation of p85 beta PIX, a Rac/Cdc42-specific guanine nucleotide exchange factor, via the Ras/ERK/PAK2 pathway is required for basic fibroblast growth factor-induced neurite outgrowth. *J Biol Chem* 277, 44417-30.
- Sigismund, S., Woelk, T., Puri, C., Maspero, E., Tacchetti, C., Transidico, P., Di Fiore, P. P. and Polo, S.** (2005). Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2760-5.
- Silver, R. B. and Pappas, G. D.** (2005). Secretion without membrane fusion: porocytosis. *Anatomical record Part B, New anatomist* 282, 18-37.
- Singer, S. J. and Nicolson, G. L.** (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-31.
- Smrz, D., Lebduska, P., Dráberová, L., Korb, J. and Dráber, P.** (2008). Engagement of Phospholipid Scramblase 1 in Activated Cells: IMPLICATION FOR PHOSPHATIDYLSERINE EXTERNALIZATION AND EXOCYTOSIS. *J Biol Chem* 283, 10904-18.
- 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.
- Söllner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H. and Rothman, J. E.** (1993a). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75, 409-18.
- Söllner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. and Rothman, J. E.** (1993b). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362, 318-24.
- Sontag, J. M., Fykse, E. M., Ushkaryov, Y., Liu, J. P., Robinson, P. J. and Sudhof, T. C.** (1994). Differential expression and regulation of multiple dynamins. *J Biol Chem* 269, 4547-54.
- Sørensen, J. B.** (2004). Formation, stabilisation and fusion of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Pflugers Arch* 448, 347-62.
- 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.
- Spilsberg, B., Llorente, A. and Sandvig, K.** (2007). Polyunsaturated fatty acids regulate Shiga toxin transport. *Biochem Biophys Res Commun* 364, 283-8.

Stace, C., Manifava, M., Delon, C., Coadwell, J., Cockcroft, S. and Ktistakis, N. T. (2008). PA binding of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase. *Adv Enzyme Regul* 48, 55-72.

Stace, C. L. and Ktistakis, N. T. (2006). Phosphatidic acid- and phosphatidylserine-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1761, 913-26.

Sun, J., Nanjundan, M., Pike, L. J., Wiedmer, T. and Sims, P. J. (2002). Plasma membrane phospholipid scramblase 1 is enriched in lipid rafts and interacts with the epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* 41, 6338-45.

Sun, L., Bittner, M. A. and Holz, R. W. (2001). Rab3a binding and secretion-enhancing domains in Rim1 are separate and unique. Studies in adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem* 276, 12911-7.

Sun-Wada, G. H., Toyomura, T., Murata, Y., Yamamoto, A., Futai, M. and Wada, Y. (2006). The $\alpha 3$ isoform of V-ATPase regulates insulin secretion from pancreatic beta-cells. *J Cell Sci* 119, 4531-40.

T

Takai, Y., Sasaki, T. and Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81, 153-208.

Takenawa, T. and Miki, H. (2001). WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci* 114, 1801-9.

Taraska, J. W., Perrais, D., Ohara-Imaizumi, M., Nagamatsu, S. and Almers, W. (2003). Secretory granules are recaptured largely intact after stimulated exocytosis in cultured endocrine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2070-5.

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

Tian, J. H., Wu, Z. X., Unzicker, M., Lu, L., Cai, Q., Li, C., Schirra, C., Matti, U., Stevens, D., Deng, C. et al. (2005). The role of Snapin in neurosecretion: snapin knock-out mice exhibit impaired calcium-dependent exocytosis of large dense-core vesicles in chromaffin cells. *J Neurosci* 25, 10546-55.

Tolias, K. F., Hartwig, J. H., Ishihara, H., Shibasaki, Y., Cantley, L. C. and Carpenter, C. L. (2000). Type I α phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase mediates Rac-dependent actin assembly. *Curr Biol* 10, 153-6.

Toomre, D. and Manstein, D. J. (2001). Lighting up the cell surface with evanescent wave microscopy. *Trends Cell Biol* 11, 298-303.

Toonen, R. F., Kochubey, O., de Wit, H., Gulyas-Kovacs, A., Konijnenburg, B., Sørensen, 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. M., Rose, S. and Marcu, M. G. (2000). Scinderin, a Ca^{2+} -dependent actin filament severing protein that controls cortical actin network dynamics during secretion. *Neurochem Res* 25, 133-44.

Trivier, E., De Cesare, D., Jacquot, S., Pannetier, S., Zackai, E., Young, I., Mandel, J. L., Sassone-Corsi, P. and Hanauer, A. (1996). Mutations in the kinase Rsk-2 associated with Coffin-Lowry syndrome. *Nature* 384, 567-70.

Tsuboi, T. (2008a). Molecular mechanism of attachment process of dense-core vesicles to the plasma membrane in neuroendocrine cells. *Neurosci Res*.

Tsuboi, T. (2008b). Molecular mechanism of docking of dense-core vesicles to the plasma membrane in neuroendocrine cells. *Med Mol Morphol* 41, 68-75.

Tsuboi, T. and Rutter, G. A. (2003). Multiple forms of "kiss-and-run" exocytosis revealed by evanescent wave microscopy. *Curr Biol* 13, 563-7.

Tsuboi, T., Zhao, C., Terakawa, S. and Rutter, G. A. (2000). Simultaneous evanescent wave imaging of insulin vesicle membrane and cargo during a single exocytotic event. *Curr Biol* 10, 1307-10.

Tucker, W. C., Edwardson, J. M., Bai, J., Kim, H. J., Martin, T. F. and Chapman, E. R. (2003). Identification of synaptotagmin effectors via acute inhibition of secretion from cracked PC12 cells. *J Cell Biol* 162, 199-209.

U

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

V

van Meer, G. and Simons, K. (1988). Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *J Cell Biochem* 36, 51-8.

van Meer, G., Voelker, D. R. and Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 112-24.

Vance, J. E. and Steenbergen, R. (2005). Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Prog Lipid Res* 44, 207-34.

Verkleij, A. J., De Maagd, R., Leunissen-Bijvelt, J. and De Kruijff, B. (1982). Divalent cations and chlorpromazine can induce non-bilayer structures in phosphatidic acid-containing model membranes. *Biochim Biophys Acta* 684, 255-62.

Vetter, I. R. and Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294, 1299-304.

Vitale, M. L., Rodriguez Del Castillo, A., Tchakarov, L. and Trifaro, J. M. (1991). Cortical filamentous actin disassembly and scinderin redistribution during chromaffin cell stimulation precede exocytosis, a phenomenon not exhibited by gelsolin. *J Cell Biol* 113, 1057-67.

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

Vitale, N., Chasserot-Golaz, S., Bailly, Y., Morinaga, N., Frohman, M. A. and Bader, M. F. (2002b). 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.

Vitale, N., Mukai, H., Rouot, B., Thierse, D., Aunis, D. and Bader, M. F. (1993). Exocytosis in chromaffin cells. Possible involvement of the heterotrimeric GTP-binding protein G(o). *J Biol Chem* 268, 14715-23.

Voets, T. (2000). Dissection of three Ca²⁺-dependent steps leading to secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron* 28, 537-45.

von Poser, C., Ichtchenko, K., Shao, X., Rizo, J. and Sudhof, T. C. (1997). The evolutionary pressure to inactivate. A subclass of synaptotagmins with an amino acid substitution that abolishes Ca²⁺ binding. *J Biol Chem* 272, 14314-9.

von Poser, C., Zhang, J. Z., Mineo, C., Ding, W., Ying, Y., Sudhof, T. C. and Anderson, R. G. (2000). Synaptotagmin regulation of coated pit assembly. *J Biol Chem* 275, 30916-24.

W

Walliser, C., Retlich, M., Harris, R., Everett, K. L., Josephs, M. B., Vatter, P., Esposito, D., Driscoll, P. C., Katan, M., Gierschik, P. et al. (2008). rac regulates its effector phospholipase Cgamma2 through interaction with a split pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* 283, 30351-62.

Wang, C. T., Lu, J. C., Bai, J., Chang, P. Y., Martin, T. F., Chapman, E. R. and Jackson, M. B. (2003). Different domains of synaptotagmin control the choice between kiss-and-run and full fusion. *Nature* 424, 943-7.

Wang, L. and Zheng, Y. (2007). Cell type-specific functions of Rho GTPases revealed by gene targeting in mice. *Trends Cell Biol* 17, 58-64.

Waselle, L., Gerona, R. R., Vitale, N., Martin, T. F., Bader, M. F. and Regazzi, R. (2005). Role of phosphoinositide signaling in the control of insulin exocytosis. *Mol Endocrinol* 19, 3097-106.

Weber, T., Zemelman, B. V., McNew, J. A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Söllner, T. H. and Rothman, J. E. (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92, 759-72.

Wendler, F., Page, L., Urbé, S. and Tooze, S. A. (2001). Homotypic fusion of immature secretory granules during maturation requires syntaxin 6. *Mol Biol Cell* 12, 1699-709.

Wenk, M. R. and De Camilli, P. (2004). Protein-lipid interactions and phosphoinositide metabolism in membrane traffic: insights from vesicle recycling in nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8262-9.

Wiedmer, T., Zhou, Q., Kwoh, D. Y. and Sims, P. J. (2000). Identification of three new members of the phospholipid scramblase gene family. *Biochim Biophys Acta* 1467, 244-53.

Wienisch, M. and Klingauf, J. (2006). Vesicular proteins exocytosed and subsequently retrieved by compensatory endocytosis are nonidentical. *Nat Neurosci* 9, 1019-27.

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. M., Grabe, M., Adams, S., Tsien, R. Y., Moore, H. P. and Machen, T. E. (2001). Mechanisms of pH regulation in the regulated secretory pathway. *J Biol Chem* 276, 33027-35.

Wu, W. and Wu, L. G. (2007). Rapid bulk endocytosis and its kinetics of fission pore closure at a central synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 10234-9.

X

Xin, X., Ferraro, F., Back, N., Eipper, B. A. and Mains, R. E. (2004). Cdk5 and Trio modulate endocrine cell exocytosis. *J Cell Sci* 117, 4739-48.

Y

Yang, T. T. and Wang, S. J. (2009). Facilitation of glutamate release from rat cerebrocortical glutamatergic nerve terminals (synaptosomes) by phosphatidylserine and phosphatidylcholine. *Synapse* 63, 215-23.

Yarar, D., Waterman-Storer, C. M. and Schmid, S. L. (2007). SNX9 couples actin assembly to phosphoinositide signals and is required for membrane remodeling during endocytosis. *Dev Cell* 13, 43-56.

Yeung, T., Gilbert, G. E., Shi, J., Silvius, J., Kapus, A. and Grinstein, S. (2008). Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science* 319, 210-3.

Yin, H. L. and Janmey, P. A. (2003). Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Physiol* 65, 761-89.

Yizhar, O. and Ashery, U. (2008). Modulating vesicle priming reveals that vesicle immobilization is necessary but not sufficient for fusion-competence. *PLoS ONE* 3, e2694.

Yoo, S. H. (1995). Purification and pH-dependent secretory vesicle membrane binding of chromogranin B. *Biochemistry* 34, 8680-6.

Z

Zachowski, A., Henry, J. and Devaux, P. F. (1989). Control of transmembrane lipid asymmetry in chromaffin granules by an ATP-dependent protein. *Nature* 340, 75-6.

Zeniou-Meyer, M., Liu, Y., Béglé, A., Olanish, M., Hanauer, A., Becherer, U., Rettig, J., Bader, M. F. and Vitale, N. (2008). The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 is implicated in calcium-regulated exocytosis through the regulation of PLD1. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 8434-9.

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). PLD1 production of phosphatidic acid at the plasma membrane promotes exocytosis of large dense-core granule at a late stage. *J Biol Chem*.

Zerial, M. and McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 107-17.

Zhang, Q., Cao, Y. Q. and Tsien, R. W. (2007). Quantum dots provide an optical signal specific to full collapse fusion of synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 17843-8.

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

Zoncu, R., Perera, R. M., Sebastian, R., Nakatsu, F., Chen, H., Balla, T., Ayala, G., Toomre, D. and De Camilli, P. V. (2007). Loss of endocytic clathrin-coated pits upon acute depletion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3793-8.

ANNEXE

Publication :

« Calcium-regulated Exocytosis in Neuroendocrine Cells: Intersectin-1L Stimulates Actin Polymerization and Exocytosis by Activating Cdc42 »

Fanny Momboisse, Stéphane Ory, Valerie Calco, Magali Malacombe, Marie-France Bader,
and Stéphane Gasman.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 2009 Jan; 1152: 209–214.

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de Documentation

Calcium-regulated Exocytosis in Neuroendocrine Cells: Intersectin-1L Stimulates Actin Polymerization and Exocytosis by Activating Cdc42

Fanny MOMBOISSE, Stéphane ORY, Valerie CALCO, Magali MALACOMBE, Marie-France BADER, Stéphane GASMAN

Annals of the New York Academy of Sciences, 2009, vol. 1152, n° 0, pages: 209-214

Pages 135-... :

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

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03998.x>

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

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

L'exocytose régulée est un processus cellulaire essentiel qui permet aux cellules d'assurer leurs fonctions spécifiques en sécrétant une multitude de signaux chimiques tels que les neurotransmetteurs, les hormones, les cytokines ou encore les facteurs de croissance. Dans les cellules neuroendocrines, l'exocytose régulée par le calcium se décompose en plusieurs étapes : le recrutement des granules de sécrétion contenant les hormones vers la périphérie cellulaire, leur arrimage au site d'exocytose de la membrane plasmique et la fusion entre les membranes plasmique et granulaire aboutissant à la libération de leur contenu dans le milieu extracellulaire. Afin de maintenir une surface cellulaire constante, l'exocytose est suivie d'une endocytose dite compensatrice. Ce processus essentiel assure le réapprovisionnement de la population granulaire et permet ainsi une libération hormonale pérenne au cours du temps. De nombreuses études mettent en évidence l'implication de différentes protéines au cours du trafic des granules de sécrétion telles que les protéines SNARE, diverses GTPases ainsi que le cytosquelette d'actine et ses régulateurs. De plus, des données récentes soulignent également l'importance du rôle des lipides. En étudiant la fonction de la GTPase Rac1 et de la Scramblase, j'ai pu mettre en évidence, au cours de mon doctorat, deux voies de régulation de l'acide phosphatidique (PA) et de la phosphatidylsérine (PS) lors de la libération hormonale dans les cellules neuroendocrines.

Dans un premier temps, mes résultats montrent l'existence d'une cascade moléculaire impliquant Scribble, β Pix et Rac1 aboutissant à la synthèse de PA au niveau des sites d'exocytose via l'activation de la phospholipase D. Ce phospholipide, en forme de cône, jouerait un rôle dans les étapes tardives en favorisant des courbures de membranes nécessaires à la fusion entre les membranes granulaire et plasmique. Ces données mettent en lumière, pour la première fois, un lien direct entre Rac1 et la fusion membranaire.

L'organisation lipidique de la membrane plasmique est naturellement asymétrique et certains phospholipides comme la PS sont concentrés sur le feuillet interne de la membrane plasmique. Or cette asymétrie membranaire est rompue au cours de l'exocytose et la PS est exposée sur la face externe de la membrane plasmique. Au cours de la seconde partie de ma thèse, je me suis intéressée à la régulation et au rôle de ce transport de PS. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence que la protéine scramblase est à l'origine de ce mécanisme. De façon intéressante, j'ai pu montrer que l'externalisation de PS n'est pas indispensable à l'exocytose des granules *per se* mais à l'endocytose compensatrice qui lui fait suite.