

# UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

*ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé*

INCI - CNRS - UPR3212

## THÈSE

Présentée par

**Marion GABEL**

Soutenue le **09 septembre 2016**

Pour obtenir le grade de Docteur de l'université de Strasbourg

Discipline : Sciences du vivant

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

## **Formation des sites d'exocytose dans les cellules chromaffines : importance fonctionnelle, régulation et externalisation de l'Annexine A2**



**THÈSE dirigée par :**

CHASSEROT-GOLAZ Sylvette

Chargée de recherche, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

DESNOS Claire  
LAMBERT Olivier

Chargée de recherche, Université Paris-Descartes  
Directeur de recherche, Université de Bordeaux

**EXAMINATEUR :**

SIMONNEAUX Valérie

Directrice de recherche, Université de Strasbourg

# Remerciements

Mes travaux de thèse ont été effectués à l'Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, UPR3212 CNRS, dirigé par **Marie France Bader**. Je tiens à la remercier de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et surtout pour l'ensemble de ses remarques sur mes travaux, toujours pertinentes et constructives. Merci également pour sa confiance, qui nous a permis de perpétuer différents événements au sein de la communauté scientifique comme les rencontres du vendredi, la fête de l'INCI ou encore les manifestations Doctoneuro.

Dans un premier temps, un merci très particulier à toutes les personnes impliquées de près ou de loin dans mon projet de thèse et lors de l'élaboration de ce manuscrit, surtout à mes relectrices de choc ! Je remercie également les membres de mon jury de thèse, **Valérie Simonneaux, Claire Desnos et Olivier Lambert** qui ont gentiment accepté de me consacrer une partie de leur temps en cette période estivale pour évaluer mon travail de thèse.

Je remercie chaleureusement **Sylvette Chasserot-Golaz**, ma directrice de thèse, de m'avoir fait découvrir le doux monde des annexines pendant ces trois années et demie ! Merci pour toutes les connaissances que tu m'as transmises, tes conseils, ta disponibilité, ta patience, nos discussions scientifiques, non scientifiques... La liste est encore longue, mais simplement merci pour ton encadrement et de m'avoir permis de réaliser ces trois années de thèse dans une ambiance conviviale.

Un grand merci également à **Nancy Grant** que j'ai eu la chance de pouvoir encore côtoyer, à quelques années près, tu aurais déjà été en train de te dorser la pilule à l'autre bout du monde 😊 Merci pour tes conseils, ta gentillesse, et tous les bons moments partagés ! Et surtout, c'est un peu grâce à toi qu'on a une jolie cuisine aujourd'hui !! Merci également aux chefs **Stéphane Gasman** et **Nicolas Vitale** de m'avoir permis d'intégrer leur équipe, Trafic membranaire dans les cellules du système nerveux. J'ai beaucoup apprécié toutes nos discussions, autant scientifiques que non scientifiques et surtout l'ambiance de travail, toujours agréable ! Un merci particulier à Steph de m'avoir fait découvrir la liste noire, qui a su occuper/dicter des temps de pause pendant ma thèse. Merci également à Nico pour ton aide lors de la préparation des liposomes qui m'ont donné bien du fil à retordre ! Un merci tout spécial à **Stéphane Ory**, alias papa Ory, pour ta disponibilité et surtout ta patience sans failles quand Icy faisait des siennes ! Merci beaucoup également pour tous les scripts que tu m'as écrits, sans lesquels mes quantifs ne seraient toujours pas finies aujourd'hui... ! Merci aussi à **Petra Toth**, pour tes conseils, ta disponibilité et ta pédagogie. J'ai beaucoup aimé travailler avec toi, notamment lors de mon monitorat, où les galères d'APBC nous auront mis à bout plus d'une

fois... Je remercie également **Yannick Bailly** pour son aide qui m'a été bien utile, quand je me suis égarée du côté du cervelet !

Un grand merci à **Tam Thahouly**, sans qui ma thèse aurait, sans doute, avancé à une toute autre allure! Merci pour les cultures, ta disponibilité, ton aide en bio mol, tes conseils...bref, un grand merci!! Une mention toute particulière à nos discussions hors contexte scientifique, qui m'auront permis de me décider à aller découvrir les 5 belles terres ☺ J'adresse également mes remerciements à **Valérie Calco**, pour sa bonne humeur et ses nombreux conseils! Je te souhaite bon vent pour ta nouvelle aventure bordelaise, j'espère que tu trouveras une nouvelle coéquipière de CAF! Mes remerciements vont également à **Claudine Boissier** pour son aide et ses bons conseils quotidiens, **Anne-Marie Haeberle** pour nos discussions pâtisseries ?/ en pâtisserie, **Gaby Ulrich** pour sa disponibilité pendant mon stage de master et **Denis Wagner** pour son aide, à maintes reprises, quand mon ordinateur et Endnote décidaient d'en faire des leurs. Merci également à **Marion Rame** ma voisine de bureau (et pas que !), pour ta disponibilité et tous les bons moments partagés.

Des remerciements particuliers également à **Sandra Lecat**, qui fût la première à m'accueillir dans son laboratoire du haut de mes connaissances de première année de licence. J'ai énormément appris à tes côtés, merci de t'être tant impliquée et de m'avoir toujours soutenue! J'espère que d'autres stagiaires pourront profiter de ta bonne humeur et de ta pédagogie et qu'ils trouveront comme je l'ai eue, la motivation pour continuer à découvrir le monde de la recherche en laboratoire !

Un grand merci à tous les doctorants et étudiants du laboratoire, **Emeline, Charlotte et Cathy** pour votre bonne humeur quotidienne, j'ai beaucoup aimé travailler à vos côtés ! Merci également à **Anaïs** pour nos nombreux fous-rires et surtout d'avoir toujours été là, même quand le moral était au plus bas ! Je n'oublie pas de remercier aussi les « anciens », **Pauline, Sèb, Antoine, Laetitia, Joseph, Célia, Laureen (...)** pour tous les bons moments partagés, surtout en dehors du laboratoire ! Merci également à tous les membres impliqués dans **Doctoneuro** comme **Elise** ou **Alvaro**, avec qui je n'ai que des bons souvenirs !

Je remercie aussi bien sûr tous mes ami(e)s qui ont essayé, tant bien que mal, de comprendre mes recherches et mon sujet de thèse. **Tania, Audrey, Céline, Constance, Gisèle, Colin, Boris, Valentine (...)** pour votre soutien sans failles, merci !

Merci infiniment à ma famille et surtout mes parents, qui m'ont toujours soutenue et permis de réaliser mes études dans les meilleures conditions.

Je finirais par remercier mon **Raphy**, pour toute l'énergie quotidienne que tu m'as apportée (surtout pendant la période de rédaction !!) ainsi que pour ton soutien et tes encouragements quotidiens qui ont toujours su me redonner le moral ! MERCI !

## Abréviations

Actine-F :	Actine sous forme filamenteuse
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARN :	Acide ribonucléique
BSA :	Bovine Serum Albumin
CgA/CgB :	Chromogranine A/B
CTX :	Toxine cholérique
DBH :	Dopamine $\beta$ -Hydroxylase
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA :	Acide ethylene-diamino-tétraacétique
EGTA :	Acide Ethylene Glycol-Tétraacétique
FCS :	Sérum de Veau Foetal
FGF :	Facteur de croissance de fibroblastes
GFP :	Green Fluorescent Protein
GST :	Glutathion S-transférase
HEPES :	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
LB :	Lysogeny broth
LDH :	Lactate Déshydrogénase
Locke N :	Solution de Locke normal
NPY :	Neuropeptide Y
PA :	Acide Phosphatidique
PFA :	Paraformaldéhyde
PKC :	Protéine Kinase C
PIP <sub>2</sub> :	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PLD1 :	Phospholipase D1
PLSCR-1 :	Phospholipid Scramblase-1
PNMT :	Phényléthanolamine N-Méthyl-Transférase
PS :	Phosphatidylsérine
P-Tyr <sup>23</sup> :	Tyrosine 23 phosphorylée
SNARE :	Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
TGN :	Réseau Trans-Golgien
t-PA :	Activateur Tissulaire du Plasminogène
TRIS :	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
Tyr <sup>23</sup> :	Tyrosine 23
WT :	Wild Type (phénotype sauvage)

# Table des matières

<b>AVANT-PROPOS</b> .....	<b>5</b>
<b>PARTIE I : INTRODUCTION GÉNÉRALE</b> .....	<b>7</b>
<b>A. L'EXOCYTOSE DANS LES CELLULES NEUROENDOCRINES</b> .....	<b>7</b>
1) INTRODUCTION .....	7
2) UN MODÈLE POUR L'ÉTUDE DE LA SÉCRÉTION NEUROENDOCRINE : LA CELLULE CHROMAFFINE .....	9
a) <i>Anatomie et histologie de la glande surrénale</i> .....	9
b) <i>Les cellules chromaffines, une population hétérogène</i> .....	11
c) <i>Avantages de l'utilisation des cellules chromaffines bovines</i> .....	12
3) LES GRANULES DE SÉCRÉTION À CŒUR DENSE .....	14
a) <i>Contenu des granules de sécrétion</i> .....	14
b) <i>Biogenèse des granules</i> .....	16
c) <i>Maturation des granules de sécrétion</i> .....	16
d) <i>Les différentes populations de granules</i> .....	18
4) LE PROCESSUS D'EXOCYTOSE RÉGULÉE .....	18
a) <i>L'étape de recrutement</i> .....	19
b) <i>L'arrimage</i> .....	21
c) <i>L'étape d'amorçage</i> .....	23
d) <i>La fusion avec la membrane plasmique</i> .....	25
5) ZOOM SUR LE RÔLE DU CYTOSQUELETTE AU COURS DE L'EXOCYTOSE .....	29
a) <i>Présentation du cytosquelette</i> .....	29
b) <i>Rôle du cytosquelette dans l'exocytose</i> .....	31
i. <i>Transport des granules de sécrétion</i> .....	31
ii. <i>La barrière d'actine corticale</i> .....	32
iii. <i>Dynamique du cytosquelette d'actine au niveau du site d'exocytose</i> .....	34
6) LE SITE D'EXOCYTOSE, UNE PLATEFORME LIPIDIQUE DYNAMIQUE .....	36
a) <i>Caractéristiques des domaines lipidiques</i> .....	36
b) <i>Rôle des microdomaines lipidiques</i> .....	38
i. <i>Effet physique sur la membrane plasmique</i> .....	38
ii. <i>Régulation de la localisation des protéines</i> .....	38
- <i>Recrutement de protéines à la membrane</i> .....	38
- <i>Concentration ou exclusion de certaines molécules</i> .....	39
iii. <i>Modulation de l'activité protéique</i> .....	39
iv. <i>Rôle dans le processus d'exocytose</i> .....	39

<b>B.</b>	<b>RÔLE DE L'ANNEXINE A2 AU COURS DE LA SÉCRÉTION NEUROENDOCRINE .....</b>	<b>43</b>
1)	LA GRANDE FAMILLE DES ANNEXINES .....	43
a)	<i>La structure des annexines</i> .....	43
i.	Le domaine C-terminal, commun à toutes les annexines .....	43
ii.	La spécificité de chaque annexine : le domaine N-terminal.....	45
b)	<i>Localisations et fonctions</i> .....	45
2)	FOCUS SUR L'ANNEXINE A2 .....	46
a)	<i>Particularités de l'annexine A2</i> .....	46
i.	Interaction avec les protéines S100 .....	48
ii.	Liaison aux phospholipides .....	50
iii.	Liaison à l'actine .....	50
b)	<i>Régulation de l'annexine A2</i> .....	52
i.	Phosphorylations des sérines par la PKC.....	52
ii.	Phosphorylation de la tyrosine 23.....	53
3)	RÔLES INTRACELLULAIRES DE L'ANNEXINE A2 .....	55
a)	<i>L'annexine A2 au cours du processus de sécrétion</i> .....	55
i.	L'annexine A2 est recrutée à la membrane plasmique des cellules stimulées .....	56
ii.	L'annexine A2 participe à l'organisation spatiotemporelle des sites d'exocytose .....	57
b)	<i>Implication de l'annexine A2 dans le processus d'endocytose</i> .....	59
4)	RÔLES EXTRACELLULAIRES DE L'ANNEXINE A2.....	59
a)	<i>L'annexine A2 dans le système fibrinolytique</i> .....	59
b)	<i>Implication de l'annexine A2 dans les processus de communication cellulaire</i> .....	61
i.	Processus d'adhésion et interactions cellulaires .....	61
ii.	Migration cellulaire .....	62
c)	<i>L'annexine A2, voie d'entrée et de sortie de plusieurs pathogènes</i> .....	63
	<b>PARTIE II : RÉSULTATS.....</b>	<b>61</b>
<b>A.</b>	<b>LA FASCICULATION DES FILAMENTS D'ACTINE PAR L'ANNEXINE A2 PARTICIPE À LA FORMATION DES DOMAINES LIPIDIQUES .....</b>	<b>65</b>
1)	INTRODUCTION .....	65
2)	PUBLICATION 1 .....	66
3)	PUBLICATION 2 .....	66
4)	DISCUSSION.....	67
a)	<i>Organisation tridimensionnelle de l'actine au niveau des sites d'exocytose</i> .....	67
b)	<i>La fasciculation de filaments d'actine par l'annexine A2 est nécessaire à la formation des microdomaines lipidiques</i> .....	68
c)	<i>La fasciculation de filaments d'actine par l'annexine A2 influence la cinétique de libération des catécholamines</i> .....	69

<b>B. RÉGULATION DE L'ANNEXINE A2 PAR PHOSPHORYLATION SUR LA TYR<sup>23</sup> AU COURS DE L'EXOCYTOSE .....</b>	<b>71</b>
1) INTRODUCTION .....	71
2) RÉSULTATS .....	73
a) <i>L'annexine A2 est phosphorylée sur la Tyr<sup>23</sup> au cours de l'exocytose .....</i>	73
b) <i>Génération de mutants non phosphorylable et phosphomimétique pour la Tyr<sup>23</sup> .....</i>	77
c) <i>La phosphorylation de la Tyr<sup>23</sup> est nécessaire à la formation des domaines lipidiques .....</i>	79
d) <i>La phosphorylation de la Tyr<sup>23</sup> régule le processus d'exocytose .....</i>	79
e) <i>L'annexine A2 affecte le recrutement des granules de sécrétion à la membrane plasmique ..</i> .....	81
3) DISCUSSION.....	83
a) <i>La phosphorylation est nécessaire au recrutement des granules de sécrétion .....</i>	84
b) <i>Quel est le rôle de la déphosphorylation de la Tyr<sup>23</sup> ? .....</i>	85
<b>C. ÉTUDE DE L'ANNEXINE A2 EXTRACELLULAIRE DANS LES CELLULES CHROMAFFINES .....</b>	<b>86</b>
1) INTRODUCTION .....	86
2) RÉSULTATS .....	88
a) <i>L'annexine A2 lie la face externe des cellules stimulées de façon calcium-dépendante .....</i>	88
b) <i>Caractérisation de l'annexine A2 extracellulaire .....</i>	90
c) <i>L'externalisation de l'annexine A2 est liée au processus d'exocytose .....</i>	94
i. Colocalisation de l'annexine A2 extracellulaire avec les sites de fusion .....	94
ii. Importance du complexe SNARE .....	96
iii. Implication de la liaison de l'annexine A2 au PS .....	96
d) <i>L'annexine A2 peut-elle être le co-récepteur du t-PA à la surface des cellules chromaffines ?</i> .....	98
i. Le t-PA extracellulaire est présent à proximité des sites d'exocytose .....	98
ii. Le t-PA colocalise avec l'annexine A2 extracellulaire .....	102
3) DISCUSSION.....	102
a) <i>Par quel mécanisme l'annexine A2 est-elle externalisée ? .....</i>	103
b) <i>Est-ce que l'annexine A2 extracellulaire participe à la régulation paracrine de la sécrétion ?</i> .....	107
<b>PARTIE III : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>109</b>
1) L'ANNEXINE A2 ET LE CYTOSQUELETTE D'ACTINE, DEUX ACTEURS INDISPENSABLES À LA MISE EN PLACE DES SITES D'EXOCYTOSE.....	110
a) <i>Quelle est l'origine des filaments d'actine fasciculés par l'annexine A2 ? .....</i>	111
b) <i>Quelle est la cinétique de formation des domaines lipidiques et de remodelage du cytosquelette d'actine ? .....</i>	112
2) LES MICRODOMAINES LIPIDIQUES, SITES D'ASSEMBLAGE ET D'ACTIVATION DE LA MACHINERIE SÉCRÉTRICE .....	113

3)	RÉGULATION DE L'ANNEXINE A2 PAR PHOSPHORYLATION .....	114
a)	<i>Quelle est la kinase responsable de la phosphorylation de la Tyr<sup>23</sup> de l'annexine A2 ?</i> .....	114
b)	<i>Quelle est la phosphatase impliquée ?</i> .....	116
4)	IMPORTANCE FONCTIONNELLE DE L'ANNEXINE A2 EXTRACELLULAIRE DANS LES CELLULES CHROMAFFINES .....	117
5)	L'ANNEXINE A2 JOUE-T-ELLE UN RÔLE DANS LES NEURONES ? .....	118
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>		<b>121</b>
1)	CULTURE CELLULAIRE, TRANSFECTION ET MESURE DE SÉCRÉTION .....	121
a)	<i>Culture primaire de cellules chromaffines bovines</i> .....	121
b)	<i>Transfection des cellules chromaffines</i> .....	122
c)	<i>Mesure de la sécrétion des catécholamines</i> .....	122
i.	Libération des catécholamines.....	122
ii.	Dosage fluorimétrique des catécholamines .....	123
2)	TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE .....	123
a)	<i>Génération de mutants de l'annexine A2 par mutagenèse dirigée</i> .....	123
b)	<i>Obtention des protéines purifiées couplées à la GST</i> .....	124
i.	Clonage .....	124
ii.	Expression et purification protéique .....	125
3)	TECHNIQUES BIOCHIMIQUES .....	125
a)	<i>Préparation de lysats cellulaires</i> .....	125
b)	<i>Isolation des exosomes</i> .....	127
c)	<i>Stimulation des cellules et externalisation de l'annexine A2</i> .....	127
d)	<i>Dosage de l'activité LDH</i> .....	127
e)	<i>Electrophorèse, électrotransfert et immunodétection (western-blot)</i> .....	128
f)	<i>Caractérisation in vitro de la liaison de l'annexine A2-GST aux lipides</i> .....	129
i.	Préparation des liposomes.....	129
ii.	Estimation de la taille des liposomes par diffusion dynamique de la lumière .....	129
iii.	Test de liaison des protéines recombinantes aux liposomes .....	130
4)	TECHNIQUES DE MICROSCOPIE .....	130
a)	<i>Immunomarquages et microscopie optique</i> .....	130
i.	Immunomarquages .....	130
ii.	Microscopie confocale .....	131
b)	<i>Feuillets membranaires, microscopie électronique et analyses statistiques</i> .....	131
i.	Préparation des feuillets de membrane plasmique et observation en microscopie électronique à transmission. ....	132
ii.	Analyse statistique de la distribution des marquages par la fonction K de Ripley .....	132
5)	AMPÉROMÉTRIE À FIBRE DE CARBONE.....	133
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>		<b>135</b>
<b>ANNEXES.....</b>		<b>157</b>

## Avant-propos

L'équipe dirigée par les docteurs Stéphane Gasman et Nicolas Vitale s'intéresse aux mécanismes moléculaires de l'exocytose régulée dans les cellules neuroendocrines. Ce phénomène très complexe requiert la participation et la coordination de multiples partenaires d'origines diverses (protéines, lipides, cytosquelette...). Pour réguler ce processus de sécrétion, l'annexine A2 semble être un candidat idéal. En effet, cette protéine sensible au calcium est capable d'interagir à la fois avec les membranes biologiques et avec l'actine, acteurs majeurs impliqués tout au long du processus d'exocytose. En formant des plateformes lipidiques capables de regrouper les différents acteurs nécessaires au bon déroulement de la sécrétion, l'annexine A2 participe à la régulation spatiotemporelle des mécanismes de l'exocytose régulée.

Le but de ma thèse a été d'étudier comment l'annexine A2 forme ces domaines lipidiques au sein de la membrane, en m'intéressant notamment au rôle du cytosquelette d'actine, et de déterminer comment elle est régulée au cours de ce processus. Un autre aspect de mon projet de thèse a également été l'étude du mécanisme d'externalisation de l'annexine A2 à la surface des cellules chromaffines au cours de la sécrétion.

Mon manuscrit comporte trois parties. La première est une introduction générale où je situerai le contexte bibliographique de mon sujet de thèse et où j'exposerai les informations nécessaires à sa compréhension. Le premier chapitre est consacré au processus de sécrétion régulée par le calcium dans les cellules neuroendocrines. Après avoir présenté le modèle expérimental de mes travaux de thèse, la cellule chromaffine, je parlerai des différentes étapes et acteurs du processus d'exocytose, de la biogenèse des granules de sécrétion jusqu'à leur fusion avec la membrane plasmique. Je me focaliserai ensuite sur l'importance du cytosquelette au cours de ce processus, et plus précisément, sur la dynamique du réseau d'actine. Pour clore ce chapitre, je présenterai les caractéristiques et les modes d'action des domaines lipidiques dans les membranes biologiques, démontrant leur importance pour la formation des sites d'exocytose.

Dans le second chapitre, je présenterai la grande famille des annexines, en m'intéressant notamment à leurs propriétés structurales et fonctionnelles. Je me focaliserai ensuite sur les particularités de l'annexine A2 et ses différents sites de régulation, en insistant particulièrement sur la tyrosine en position 23. J'aborderai ensuite les rôles de cette protéine dans le trafic membranaire intracellulaire puis je présenterai les rôles extracellulaires de l'annexine A2.

La deuxième partie de mon manuscrit présente les résultats obtenus au cours de ma thèse. Le premier chapitre est consacré à ma publication portant sur l'importance du cytosquelette d'actine et de l'annexine A2 dans la formation des domaines lipidiques au cours du processus de sécrétion. Le second chapitre traite de la régulation de l'annexine A2 au cours de ce processus. Nous avons mis en évidence l'importance de la phosphorylation sur la tyrosine 23 de l'annexine A2 au cours de la sécrétion. Les résultats obtenus sur l'externalisation de l'annexine A2 au cours du processus d'exocytose font l'objet du dernier chapitre.

Finalement, la troisième partie de ce manuscrit est une discussion sur l'ensemble de mes résultats de thèse. J'y exposerai le rôle de l'annexine A2 et du cytosquelette d'actine dans la mise en place des sites d'exocytose et celui des microdomaines lipidiques comme plateforme d'assemblage de la machinerie sécrétrice. J'aborderai ensuite la régulation de l'annexine A2 par phosphorylation ainsi que son importance fonctionnelle à l'extérieur des cellules chromaffines et dans les cellules neuronales.

En conclusion, l'ensemble des données exposées dans ce manuscrit permette de mieux comprendre le rôle de l'annexine A2 et de l'actine dans la mise en place des plateformes lipidiques au cours du processus d'exocytose. Ces résultats représentent une avancée significative pour la compréhension de la régulation spatiotemporelle du processus de sécrétion dans les cellules neuroendocrines.

# **Partie I :**

# **Introduction générale**

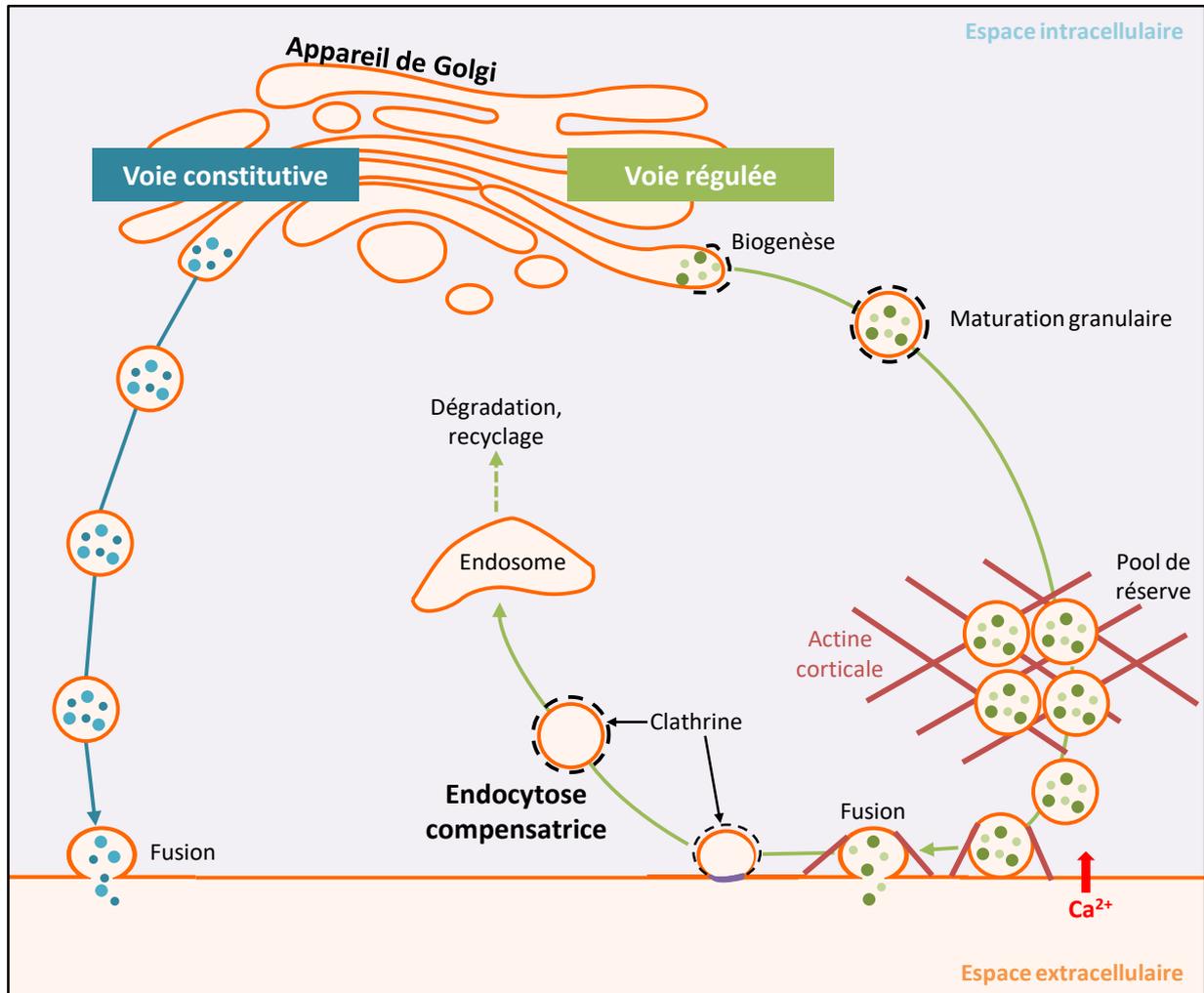
# A. L'exocytose dans les cellules neuroendocrines

## 1) Introduction

L'exocytose est un mécanisme biologique fondamental qui permet à une cellule de libérer dans le milieu extracellulaire, des macromolécules stockées dans des vésicules. Ce mécanisme assure le maintien de l'intégrité des cellules et l'homéostasie de l'organisme (Burgoyne et Morgan, 2003). Ce processus crucial est également impliqué dans de nombreuses fonctions comme la migration ou la communication cellulaire. En effet, la libération de messagers dans le milieu extracellulaire permet aux cellules d'envoyer des informations de régulation et de signalisation à d'autres cellules.

Le processus d'exocytose requiert des granules ou vésicules de sécrétion, présents dans le cytoplasme des cellules et contenant des molécules informatives. Ces vésicules de sécrétion vont fusionner avec la membrane plasmique, afin de libérer leur contenu dans l'espace extracellulaire. On distingue deux types d'exocytose (**Figure 1**). Le premier, appelé exocytose constitutive, a lieu de façon permanente dans toutes les cellules. Il est notamment responsable de l'apport et du renouvellement des lipides et des protéines constituant la membrane plasmique (Stojilkovic, 2005). La seconde forme d'exocytose est dite "régulée" car elle nécessite la réception d'un signal externe pour être déclenchée. Le message reçu va alors induire une augmentation de calcium dans la cellule et permettre la libération du contenu des granules dans le milieu extracellulaire. Seules des cellules spécialisées sont capables de sécrétion régulée : ce sont les cellules communément appelées cellules sécrétrices.

Le processus d'exocytose régulée génère une réponse adaptée à une demande spécifique de l'organisme, *via* la libération de neurotransmetteurs et d'hormones contenus dans les vésicules de sécrétion. Ces molécules informatives, libérées dans l'espace extracellulaire, permettent une communication privilégiée entre les cellules sécrétrices et le reste de l'organisme et peuvent agir spécifiquement au niveau d'organes cibles pour induire une réponse appropriée. Le processus d'exocytose régulée a aussi un intérêt pour la cellule :



**Figure 1 : Processus d'exocytose dans les cellules neuroendocrines.**

L'exocytose constitutive (en bleu) ne nécessite pas d'étape particulière lors de l'acheminement des granules de sécrétion à la membrane plasmique. À l'inverse, dans l'exocytose régulée (en vert), les granules de sécrétion subissent une étape de maturation et de stockage avant d'atteindre la périphérie cellulaire où leur fusion sera déclenchée par un signal calcique.

il lui fournit un apport de membrane lui permettant d'augmenter sa surface cellulaire, ce qui est nécessaire à divers processus tels que la phagocytose, la migration ou la différenciation cellulaire. Un autre rôle est l'insertion de protéines dans la membrane plasmique comme des récepteurs, canaux ou transporteurs, pour induire la potentialisation d'une réponse cellulaire donnée (Chiergatti et Meldolesi, 2005).

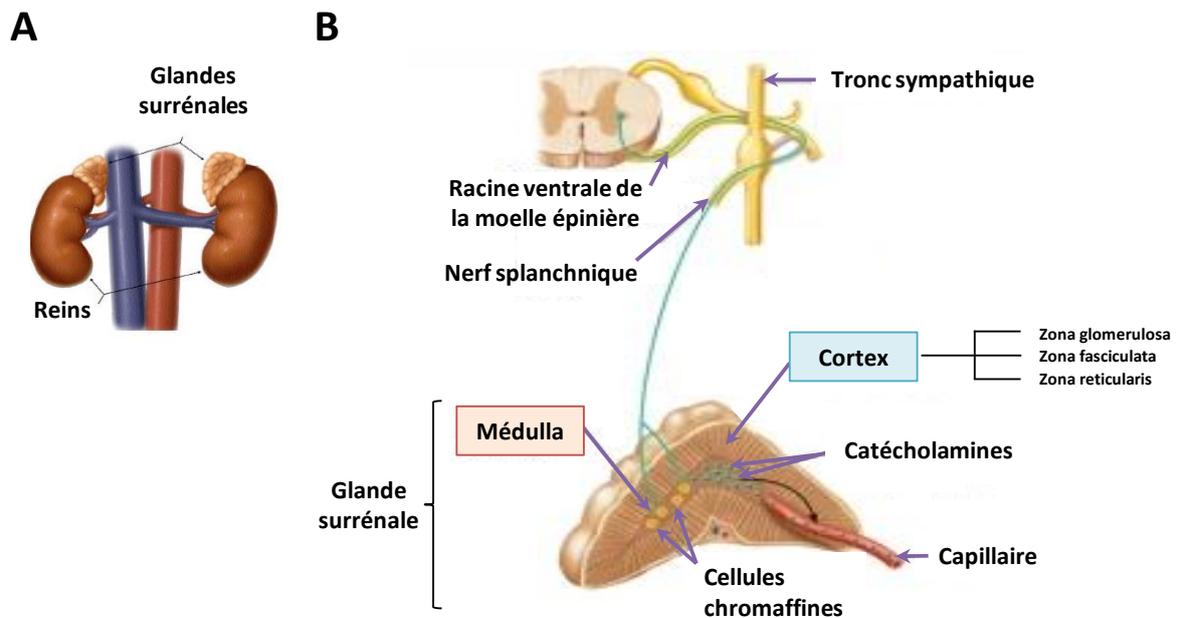
Dans un premier temps, je décrirai le modèle cellulaire utilisé pour mes travaux, les cellules chromaffines, puis je présenterai les différentes étapes ainsi que les acteurs impliqués dans le processus d'exocytose régulée. J'exposerai ensuite l'intérêt de la mise en place de plateformes lipidiques dynamiques au niveau des sites d'exocytose.

## 2) Un modèle pour l'étude de la sécrétion neuroendocrine : la cellule chromaffine

Les cellules neuroendocrines sont un groupe hétérogène de cellules aux origines embryonnaires et localisations diverses. Ces cellules spécialisées partagent la propriété commune de renfermer des granules de sécrétion dont le contenu en hormones et en neuropeptides est sécrété par exocytose régulée en réponse à un stimulus externe. Les cellules neuroendocrines utilisées pour mes travaux de thèse sont des cellules issues de la glande surrénale, les cellules chromaffines. Elles ont été nommées ainsi car en présence de sels de chrome, les catécholamines qu'elles contiennent s'oxydent et donnent une couleur brunâtre aux cellules.

### a) Anatomie et histologie de la glande surrénale

Les glandes surrénales sont au nombre de deux et sont situées, comme leur nom l'indique, juste au-dessus de chaque rein. La glande surrénale est composée de deux parties : le cortex ou corticosurrénale (d'origine mésodermique) et la médulla également appelée médullosurrénale (d'origine ectodermique, et plus précisément de la crête neurale (Diaz-Flores et al., 2008) (**Figure 2, A**). La corticosurrénale est formée de trois couches aux propriétés sécrétoires différentes. La zone glomérulée, la plus externe, assure la production de minéralocorticoïdes. La zone fasciculée synthétise les glucocorticoïdes et la zone réticulée, la plus interne au cortex, sécrète les androgènes. Les cellules chromaffines se



**Figure 2 : Les glandes surrénales.**

**A. Localisation.** Les glandes surrénales sont situées directement au-dessus des reins.

**B. Innervation.** Une coupe transversale montre la partie corticale, subdivisée en trois zones, et la partie centrale médullaire composée des cellules chromaffines. Suite à une stimulation cholinergique par le nerf splanchnique, ces cellules libèrent des catécholamines qui se déversent dans la circulation sanguine pour aller agir sur des organes cibles.

Source : <http://antranik.org/the-autonomic-nervous-system/>

trouvent dans la partie médullaire et sont regroupées en amas autour de capillaires. En contact avec les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, elles assurent la sécrétion de catécholamines dans la circulation sanguine (Aunis et Langley, 1999).

La médullosurrénale est souvent appelée "glande du stress" : en effet, les cellules chromaffines sont capables de libérer des catécholamines (adrénaline, dopamine et noradrénaline) lorsque l'organisme subit une situation de stress (**Figure 2, B**). Cette libération hormonale est régulée par le système nerveux sympathique, notamment *via* l'innervation de la médulla par le nerf splanchnique (Mravec, 2005). L'acétylcholine libérée par les neurones pré-ganglionnaires agit directement sur les récepteurs cholinergiques nicotiniques présents à la surface des cellules chromaffines. Ces récepteurs ionotropiques permettent l'entrée de sodium qui crée une dépolarisation des cellules, activant les canaux calciques voltage-dépendant, qui à leur tour, permettent de déclencher l'exocytose grâce à l'entrée d'ions calciques. Les catécholamines sécrétées suite à une stimulation vont alors pouvoir agir au niveau de différents organes cibles en se fixant sur leurs récepteurs. Suite à une situation d'urgence, les réponses d'adaptation peuvent être variées comme une augmentation du rythme cardiaque (*via* l'activation des récepteurs adrénergiques  $\beta_1$  situés au niveau du cœur), du taux de glucose sanguin (*via* l'activation des récepteurs  $\alpha_2$  au niveau des cellules  $\beta$  pancréatiques) ou une régulation de la pression sanguine (*via* l'activation de plusieurs récepteurs présents sur différentes artères) (Bulbring et Tomita, 1987, Aunis et Langley, 1999).

## **b) Les cellules chromaffines, une population hétérogène**

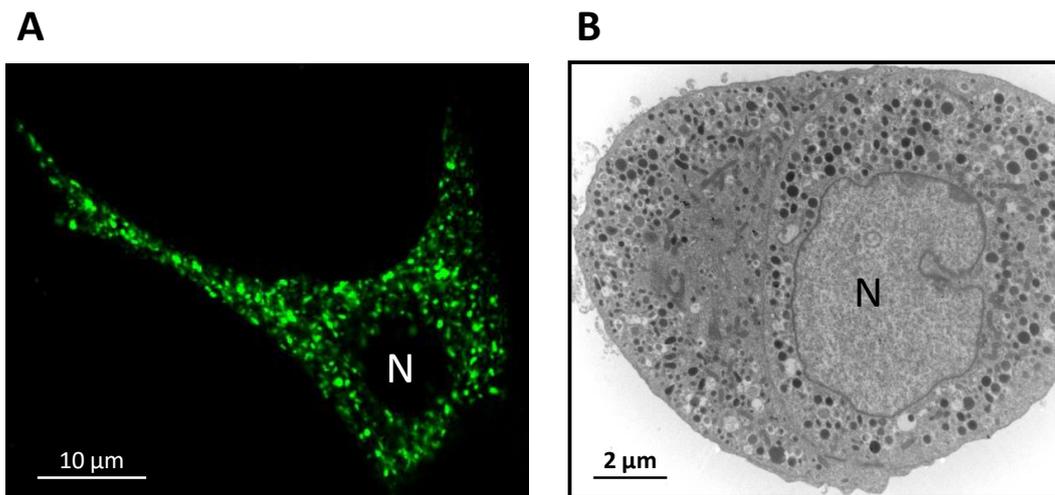
Les cellules chromaffines sont subdivisées en au moins deux populations, selon qu'elles sécrètent l'adrénaline ou la noradrénaline. Les cellules adrénergiques sont généralement situées en périphérie de la médulla (adjacentes à la corticosurrénale) alors que les cellules noradrénergiques sont localisées au centre de la partie médullaire (Coupland, 1989). La proportion des deux types de cellules varie selon les espèces. Chez le bœuf, la majorité des cellules (environ 70%) sont adrénergiques. Ces deux populations de cellules se différencient également par leur contenu protéique. En effet, la Phényléthanolamine N-méthyl-transférase (PNMT), enzyme responsable de la synthèse d'adrénaline, est uniquement présente dans les cellules adrénergiques, tout comme la

protéine S100A10 (Umbrecht-Jenck et al., 2010). Certains acteurs impliqués dans le processus d'exocytose comme la SNAP-23 et la SNAP-25 ne sont également pas exprimés de la même façon par toutes les cellules chromaffines (Grant et al., 1999). L'isoforme b de la SNAP-23 est par exemple uniquement exprimé dans les cellules adrénérergiques. La sensibilité des deux types cellulaires au calcium est également différente. Les cellules adrénérergiques sont dix fois plus sensibles au calcium que les cellules noradrénérergiques (Chasserot-Golaz et al., 1996). D'autres molécules contenues dans les granules de sécrétion, comme l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) ou le neuropeptide Y (NPY), ne sont présentes que dans une sous-population de cellules chromaffines qui ne correspond pas au phénotype adrénérergique ou noradrénérergique (Weiss et al., 2014b). Il existe donc probablement plusieurs sous-types de cellules chromaffines aux propriétés et aux fonctions différentes, qui permettent une régulation fine et précise de la sécrétion de catécholamines.

### **c) Avantages de l'utilisation des cellules chromaffines bovines**

Mes travaux de thèse ont été réalisés sur des cellules chromaffines de bœuf en culture primaire, modèle de choix pour l'étude de la sécrétion neuroendocrine. Tout d'abord, les cellules chromaffines ont la même origine embryonnaire que les neurones. La machinerie d'exocytose est donc proche de celles des cellules neuronales : on retrouve de nombreux acteurs du processus de sécrétion comme les protéines Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor (SNARE) (Becherer et Rettig, 2006, Rizo et Rosenmund, 2008), l'activation des mêmes cascades intracellulaires (Bader et al., 2004) et des mécanismes de régulation semblables (Bernstein et al., 1998, Morales et al., 2000, Rust et Maritzen, 2015).

L'utilisation de cellules chromaffines bovines présente également plusieurs avantages techniques. En effet, elles sont aisément dissociables de la partie corticosurrénalienne et lors de la culture de cellules chromaffines, il est possible d'en recueillir un nombre considérable. 15 à 20 millions de cellules sont ainsi obtenues à partir d'une seule glande surrénale. Ceci permet donc de faire des expériences de biochimie nécessitant un nombre important de cellules, ainsi que des études immunocytologiques et des observations sur cellules vivantes. De plus, les cellules chromaffines peuvent être transfectées par électroporation avec une efficacité pouvant atteindre 15 à 20%.



**Figure 3 : Visualisation des granules de sécrétion d'une cellule chromaffine.**

**A. En microscopie confocale.** Les granules de sécrétion sont visualisés avec un anticorps dirigé contre la chromogranine A, révélé par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-488.

**B. En microscopie électronique à transmission.** Les granules de sécrétion apparaissent en noir car ils sont denses aux électrons. La lettre N indique l'emplacement du noyau.

Un autre avantage des cellules chromaffines bovines est leur taille. En effet, ces cellules de grande taille (de 15 à 20  $\mu\text{m}$ ) favorisent les études sur cellule unique comme le permet l'ampérométrie. Cette technique électrophysiologique permet d'enregistrer les événements d'exocytose d'une cellule isolée. Une électrode en fibre de carbone, maintenue à un potentiel imposé de +650 mV pour permettre l'oxydation des catécholamines, est positionnée à la surface d'une cellule. Cette électrode mesure le courant électrique produit par l'oxydation des catécholamines libérées dans le milieu extracellulaire, suite à une stimulation chimique (Bader et al., 2002). Les cellules chromaffines bovines possèdent également des granules de sécrétion d'une taille importante (de 200 à 300 nm) facilement observables au microscope confocal (**Figure 3, A**) mais aussi au microscope électronique à transmission car ils sont denses aux électrons à cause de la forte concentration en protéines et en peptides qu'ils contiennent (**Figure 3, B**).

### 3) Les granules de sécrétion à cœur dense

Dans les cellules neuronales, les neurotransmetteurs et les neuromodulateurs peuvent être stockés dans différents types de vésicules. Les neurotransmetteurs comme le GABA, la glycine ou le glutamate sont contenus dans des vésicules synaptiques de petites tailles qui sont transparentes en microscopie électronique. Dans les neurones ou dans les cellules neuroendocrines, les peptides, amines biogènes et neurotrophines, responsables de la régulation de divers processus physiologiques, sont eux contenus dans des vésicules à cœur dense de taille plus importante.

#### a) Contenu des granules de sécrétion

Les principaux composants des granules de sécrétion des cellules chromaffines sont les catécholamines. Lors de leur biogenèse, la dopamine, présente dans le cytoplasme de toutes les cellules chromaffines, va être captée par un transporteur présent dans la membrane granulaire (VMAT, Vesicular Monoamine Transporteur) et concentrée à l'intérieur des granules de sécrétion. La Dopamine  $\beta$ -hydroxylase (DBH), enzyme présente sur la face interne des granules de sécrétion, va alors hydroxyler la dopamine en noradrénaline. Dans les cellules adrénérgiques, la noradrénaline va être à nouveau exportée

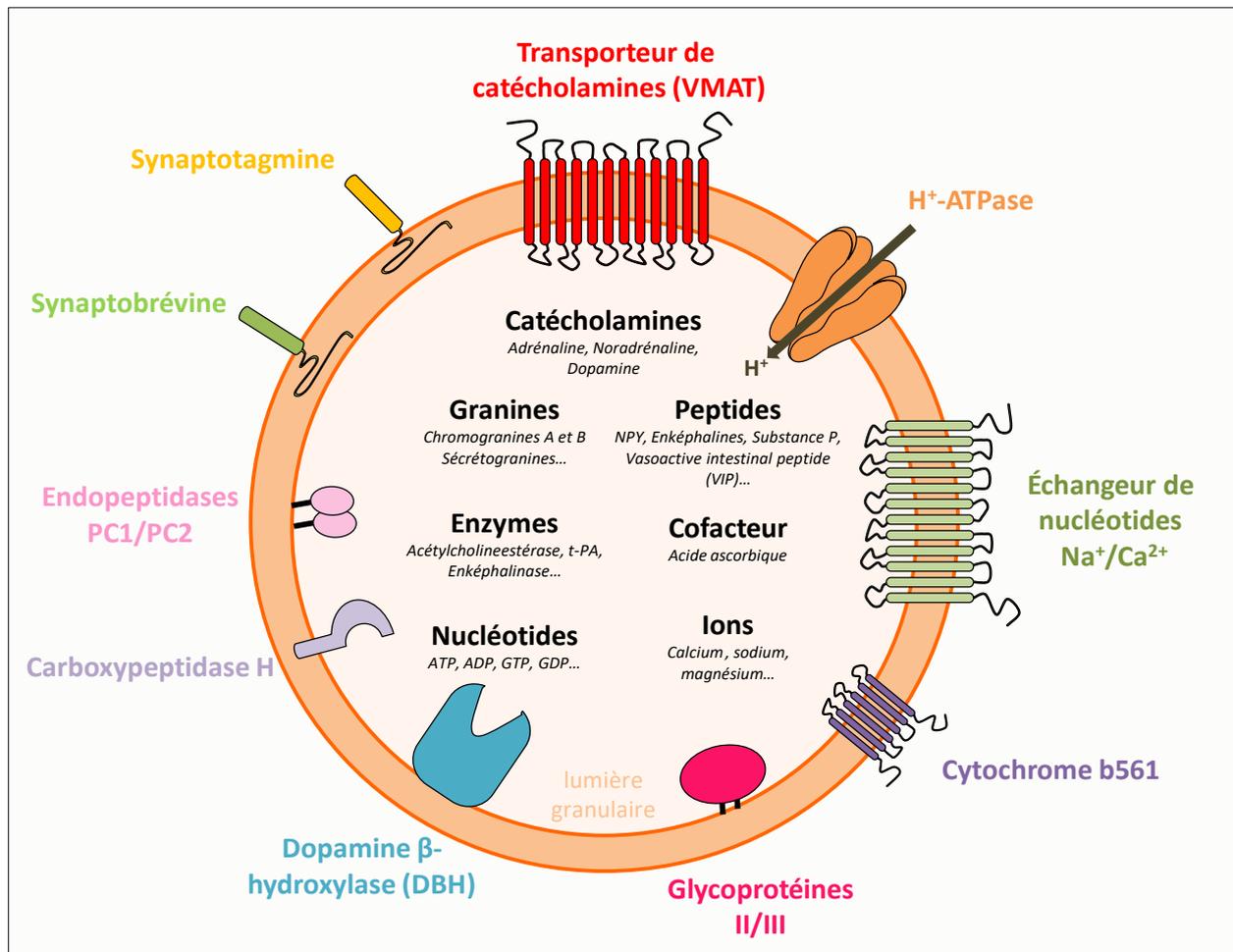


Figure 4 : Les principaux constituants des granules de sécrétion des cellules chromaffines.

dans le cytoplasme où, la conversion de la noradrénaline en adrénaline va avoir lieu sous l'action de la PNMT. Puis, l'adrénaline sera à nouveau amenée à l'intérieur des granules de sécrétion grâce aux transporteurs VMAT (Trifaro, 2002). La PNMT est uniquement présente dans les cellules adrénériques et constitue donc un marqueur de cette population cellulaire.

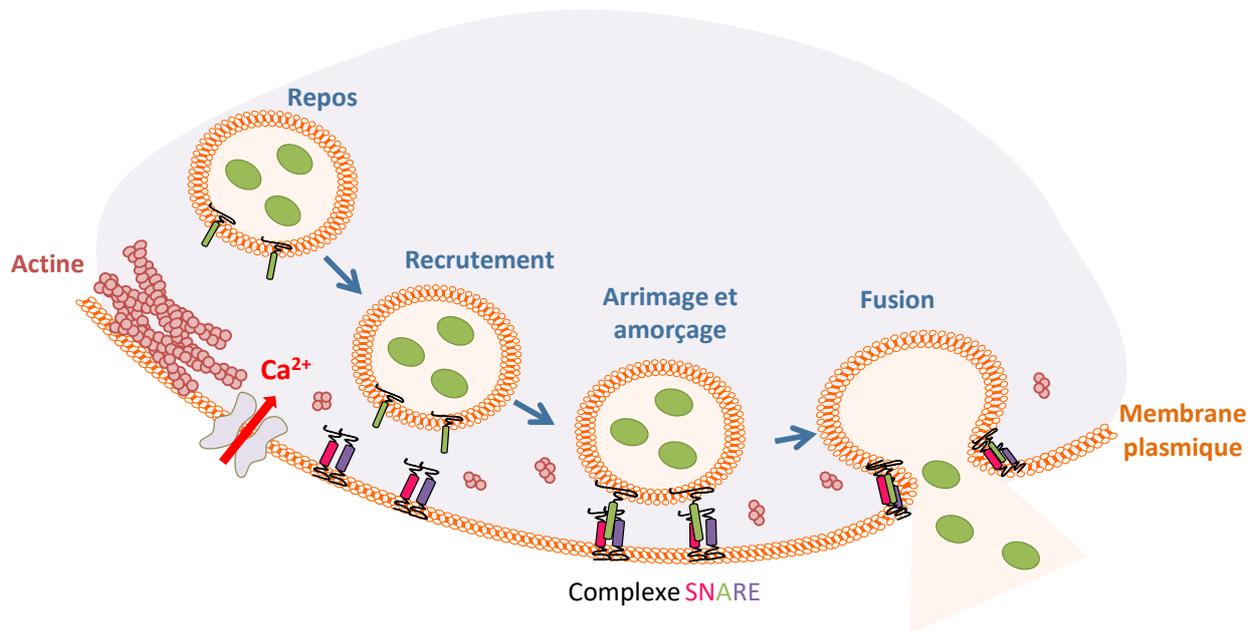
En plus des catécholamines, de nombreuses autres molécules sont présentes dans les granules des cellules chromaffines, comme les chromogranines, les enképhalines ou les neuromodulateurs (Apps, 1997, Winkler, 1997, Crivellato et al., 2008). Une liste détaillée des composants granulaires est présentée **Figure 4**.

### **b) Biogenèse des granules**

La formation des granules de sécrétion est initiée au niveau du réseau trans-Golgien (TGN). L'agrégation de protéines destinées à être sécrétées est le point de départ de la biogenèse des granules. À cette étape, des protéines de la famille des granines, comme les chromogranines A et B (CgA et CgB), ont un rôle primordial (Huh et al., 2003, Taupenot et al., 2003). Il a été montré que l'inhibition de l'expression de la CgA dans des cellules de phéochromocytome de rat induit une diminution du nombre de granules de sécrétion (Kim et al., 2001, Courel et al., 2006, Elias et al., 2012). À l'inverse, la surexpression de CgA dans des cellules non sécrétrices induit la formation de vésicules mobiles à cœur dense, capables de stocker des hormones (Montero-Hadjadje et al., 2009). En présence de calcium et à pH acide, les granines forment des agrégats qui interagissent avec des domaines lipidiques présents dans la membrane du TGN. Ces domaines, riches en glycosphingolipides et en cholestérol, permettent le bourgeonnement des granules immatures (Dhanvantari et Loh, 2000). L'implication de la clathrine dans ce processus ainsi qu'une synthèse locale de lipides, facilitant la courbure membranaire, ont également été décrites (Siddhanta et al., 2000, Kim et al., 2006, Tanguy et al., 2016).

### **c) Maturation des granules de sécrétion**

Après leur bourgeonnement, pour devenir matures, les granules doivent subir une série de changements morphologiques et biochimiques. Ils passent notamment par une



**Figure 5 : Les différentes étapes de l'exocytose régulée.**

Lors d'une stimulation par un sécrétagogue, l'élévation du calcium intracellulaire induit la dépolymérisation du cytosquelette d'actine et le recrutement des granules de sécrétion à la membrane plasmique. L'étape d'arrimage va ensuite permettre la liaison des membranes granulaire et plasmique, *via* l'assemblage d'un complexe multiprotéique, le complexe SNARE. Pendant l'amorçage, la machinerie d'exocytose s'assemble et devient fonctionnelle, conduisant à la dernière phase du processus, l'étape de fusion, pendant laquelle le contenu granulaire est libéré à l'extérieur de la cellule.

étape d'augmentation de leur taille suivie d'une perte de leur manteau de clathrine (Tooze et al., 1991). Les granules sont également confrontés à l'acidification progressive de leur contenu *via* l'activation d'une pompe à protons, la V-ATPase (Wu et al., 2001, Poëa-Guyon et al., 2013). Cette entrée de protons conduit à l'acidification intra-granulaire et permet de générer la force motrice nécessaire à l'entrée des catécholamines dans les granules de sécrétion. Le changement de pH active également des enzymes comme les pro-hormones convertases et les endopeptidases, aboutissant à la conversion des pro-hormones non fonctionnelles en hormones fonctionnelles (Urbe et al., 1997).

#### d) Les différentes populations de granules

Parmi les 30 000 granules présents dans une cellule chromaffine, tous n'ont pas la même probabilité de libération. Dans les cellules, on distingue quatre populations (Becherer et Rettig, 2006) : la majeure partie des granules (environ 95%) constitue le pool de réserve, correspondant aux granules qui ne sont pas en contact avec la membrane plasmique car ils sont maintenus dans le réseau cortical d'actine qui forme une barrière (Vitale et al., 1995). Les autres granules sont localisés au niveau de la membrane plasmique et se différencient selon leur état de maturation. Il y a un pool de granules arrimés (UPP pour Unprimed Pool) qui nécessite encore une étape de maturation dépendante de l'ATP. Un autre pool contient les granules amorcés non compétents pour la fusion (SRP pour Slowly Releasable Pool) et le dernier pool comporte les granules amorcés, prêts à fusionner (RRP pour Readily Releasable Pool) et qui seront donc les premiers à être libérés lors d'une stimulation.

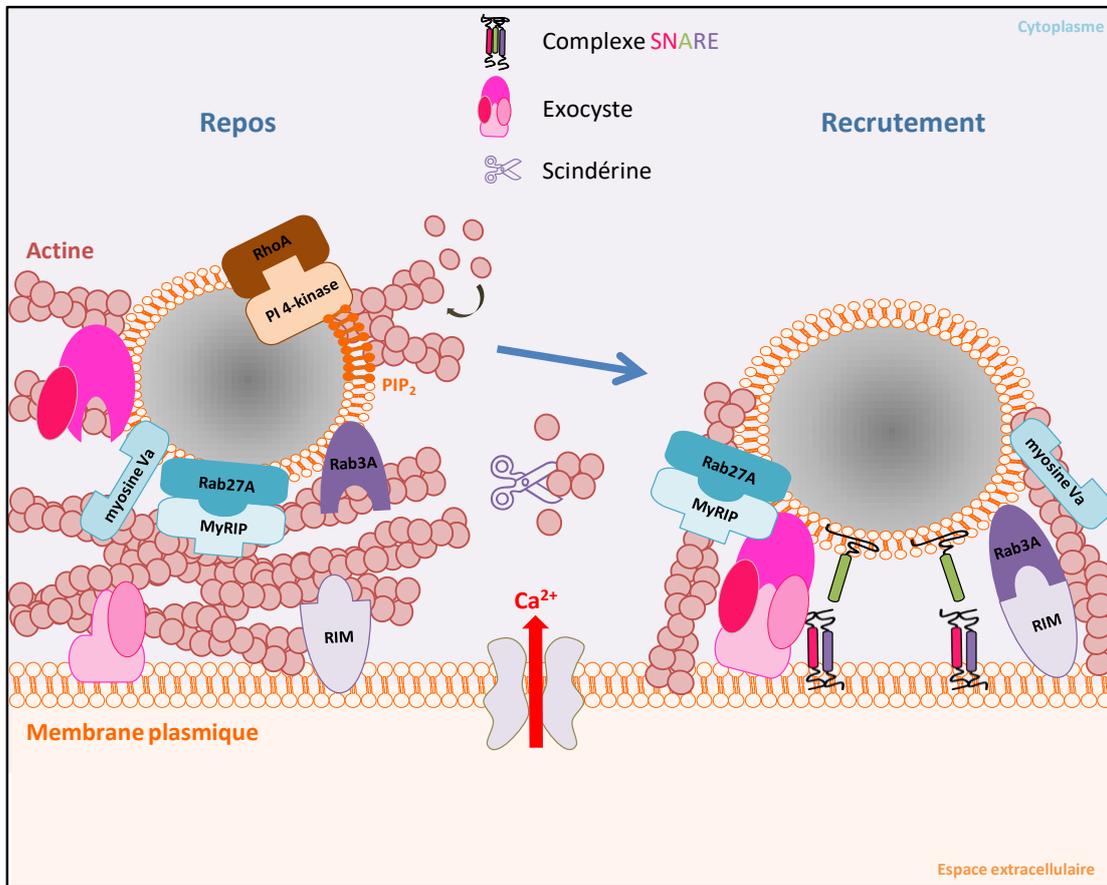
#### 4) Le processus d'exocytose régulée

Les sous-groupes de granules passeront tous, mais de façon asynchrone, par les différents stades de l'exocytose (**Figure 5**) : le recrutement à la membrane plasmique, l'arrimage, l'amorçage puis la fusion. Le signal déclencheur de ces différentes étapes est l'entrée de calcium. Dans les cellules chromaffines, l'augmentation de calcium intracellulaire est provoquée *in vivo* par l'acétylcholine libérée par le nerf splanchnique et *in vitro* par un sécrétagogue (Barclay et al., 2005).

## a) L'étape de recrutement

La majorité des granules de sécrétion présents au sein d'une cellule chromaffine sont "emprisonnés" dans un réseau de filaments d'actine. La GTPase RhoA, localisée sur les granules de sécrétion, empêche le recrutement des granules à la membrane, *via* son contrôle sur le cytosquelette d'actine. Ce mécanisme implique la phosphatidylinositol 4-kinase, présente sur les granules de sécrétion, qui synthétise localement du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) au niveau de la membrane granulaire (Gasman et al., 1998). Ces domaines de PIP<sub>2</sub> pourraient agir comme site de nucléation de nouveaux filaments pour stabiliser les granules dans le réseau d'actine cortical et restreindre leur accès à la membrane (Bader et al., 2004).

Après stimulation, les granules de sécrétion doivent accéder à la membrane plasmique. La scindérine, protéine activée par le calcium, coupe les filaments d'actine en petits fragments. Elle permet la destruction de la barrière d'actine responsable du blocage et de la rétention des granules (Trifaro et al., 2000). L'étape suivante est l'adressage des granules à la membrane plasmique. L'implication de plusieurs protéines de la famille des GTPases monomériques, présentes sur les granules de sécrétion comme Rab3A et Rab27A, a été établie (Darchen et al., 1995, Desnos et al., 2003). La protéine Rab3A est capable de lier plusieurs acteurs impliqués dans l'exocytose, en particulier les protéines du complexe SNARE ou la protéine Rim, localisée à la membrane plasmique (Johannes et al., 1996, Wang et al., 1997). La reconnaissance par Rab3A de ses effecteurs pourrait permettre l'adressage du granule vers la membrane plasmique. L'implication de la GTPase Rab27A dans ce processus se fait par l'intermédiaire de son partenaire MyRIP, capable de lier le cytosquelette d'actine (Desnos et al., 2003, Huet et al., 2012). La myosine Va, liant elle aussi l'actine, contrôle la mobilité des granules pour permettre un adressage et un arrimage efficaces (Rudolf et al., 2003, Desnos et al., 2007a). La myosine VI intervient également dans ce processus. Recrutée de façon calcium-dépendante au niveau des granules de sécrétion, elle permet de les amener activement le long des filaments d'actine, vers la membrane plasmique, afin de maintenir un pool de granules actifs (Tomatis et al., 2013).



**Figure 6 : L'étape de recrutement du granule à la membrane plasmique.**

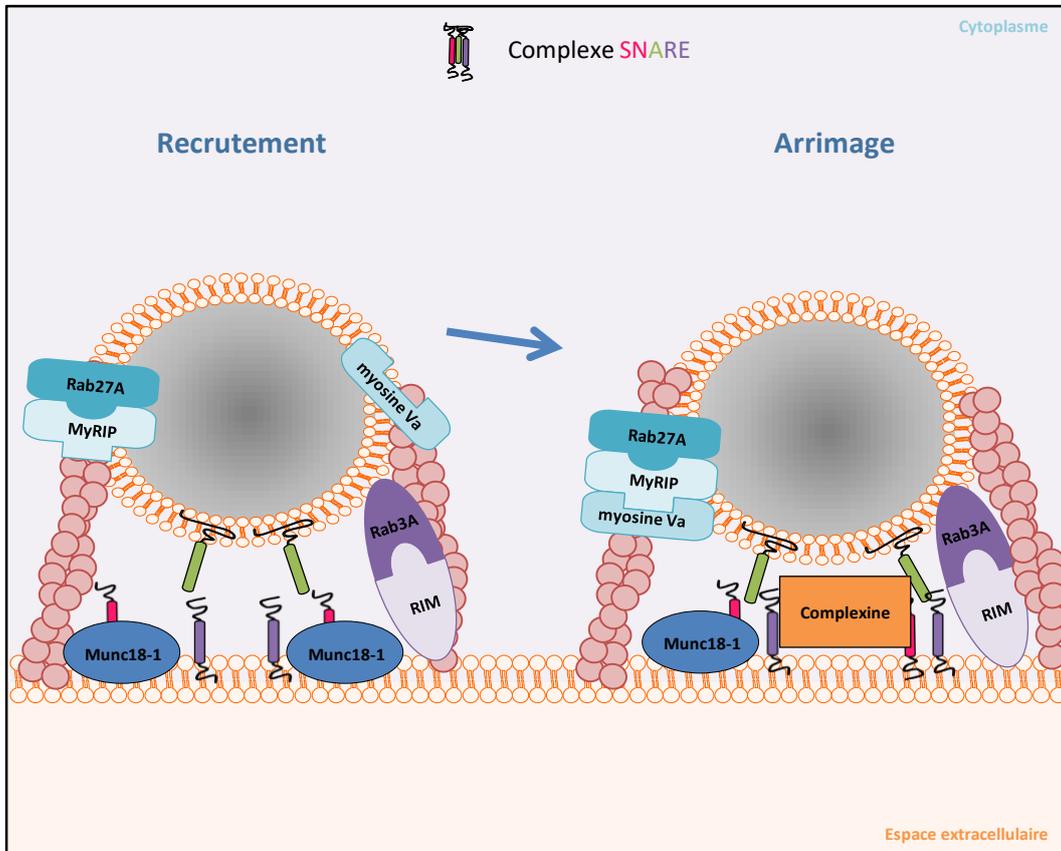
Au repos, le granule de sécrétion est emprisonné dans le réseau d'actine cortical où sa mobilité est contrôlée par la myosine Va, RhoA et la PI 4-kinase. Lors d'une entrée de calcium, la dépolymérisation du cytosquelette d'actine permet le recrutement du granule à la membrane. Cette étape implique la reconnaissance d'effecteurs au niveau de la membrane plasmique par des protéines situées au niveau du granule de sécrétion. Ainsi, la formation du complexe de l'exocyste et la liaison de Rab3A à son effecteur RIM, participent à l'adressage du granule. La liaison de la GTPase granulaire Rab27A à MyRIP permet également de faire le lien entre le granule de sécrétion et le cytosquelette d'actine.

Pour positionner de façon adéquate le granule à la membrane plasmique, un complexe multiprotéique se met également en place pour assurer une reconnaissance spatiale. L'exocyste est constitué de plusieurs sous-unités, localisées au niveau des membranes plasmique et granulaire. Leur assemblage va permettre de stabiliser le granule à la membrane plasmique. Ce complexe possède également des domaines de liaison à plusieurs acteurs de l'exocytose comme aux protéines SNARE (que l'exocyste est capable d'activer), à la protéine MyRIP (Goehring et al., 2007) ou aux petites GTPases, capables de réguler l'assemblage de l'exocyste (Heider et Munson, 2012). Le recrutement du granule à la membrane plasmique est donc un processus complexe, qui nécessite l'intervention et la coordination d'une multitude de partenaires présentés **Figure 6**.

## **b) L'arrimage**

Les granules parvenus à la membrane plasmique vont alors s'y arrimer grâce à la formation d'un complexe multiprotéique, le complexe SNARE. Il est formé à la fois de protéines situées au niveau des granules (synaptobrévine/VAMP) et de la membrane plasmique (SNAP-25, syntaxine). Il faut toutefois noter que cette répartition n'est pas stricte : en effet, la SNAP-25 et la syntaxine peuvent être sur la membrane granulaire, la VAMP2 à la membrane plasmique (Tagaya et al., 1995, Tagaya et al., 1996, Umbrecht-Jenck et al., 2010) et les trois protéines SNARE peuvent également être associées à la membrane plasmique (Lang et al., 2002). Ces complexes SNARE associés en *cis*, s'opposent aux complexes formés en *trans*, c'est-à-dire sur deux membranes opposées. C'est l'association du complexe SNARE en *trans* qui permet l'association active des membranes vésiculaires et plasmiques pendant l'étape d'arrimage (Burgoyne et Morgan, 2003). Dans les cellules neuroendocrines, ce sont les isoformes syntaxine-1, SNAP-25 et VAMP2 qui sont impliqués dans la formation de ce complexe (Sollner et al., 1993). Ces protéines vont s'assembler en hétérotrimère, *via* leurs domaines en hélice  $\alpha$ , et permettre le rapprochement des membranes granulaire et plasmique par un mécanisme de "fermeture éclair".

L'arrimage est régulé par différents acteurs. Munc18-1 est une protéine soluble, capable de lier la syntaxine-1 en conformation "fermée", c'est-à-dire, incapable d'interagir avec ses partenaires (SNAP-25 et VAMP2) pour former le complexe SNARE (Voets et al., 2001, Toonen et al., 2006b). Munc18-1 pourrait agir comme une protéine chaperonne pour



**Figure 7 : Les différents acteurs impliqués dans l'étape d'arrimage du granule à la membrane plasmique.**

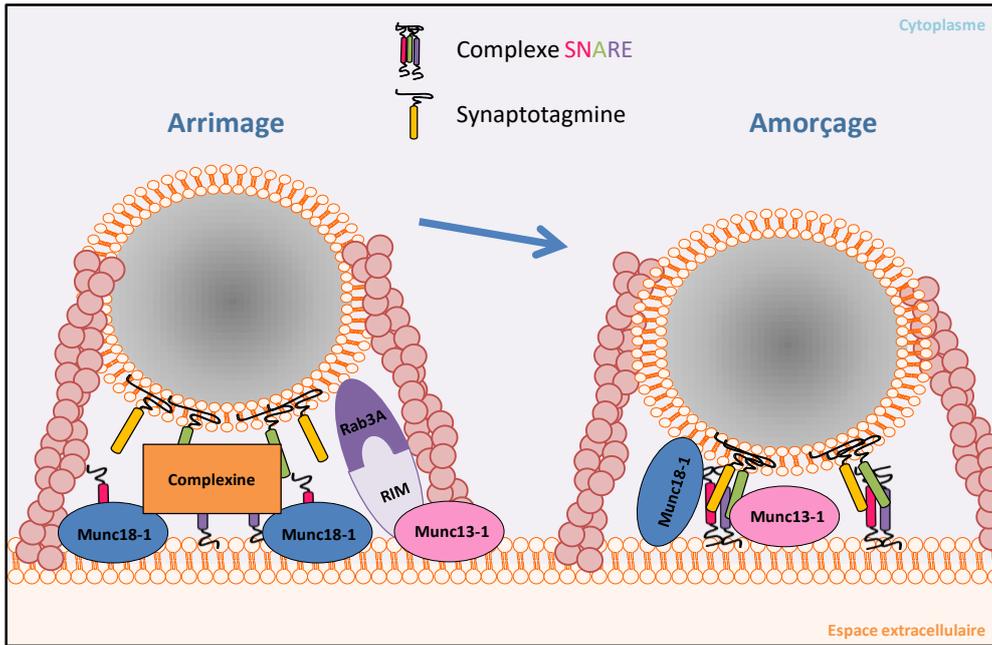
Lorsque le granule arrive à la membrane plasmique, la protéine Munc18-1 interagit avec la syntaxine-1 et la stabilise en conformation fermée. La complexine empêche l'assemblage complet du complexe SNARE. La myosine Va et MyRIP participent également à l'étape d'arrimage *via* leur liaison à la protéine Rab27A et au cytosquelette d'actine. Ces protéines pourraient lier des effecteurs membranaires comme Munc18-1 ou la syntaxine-1 afin de stabiliser le granule à la membrane.

stabiliser la syntaxine-1 à la membrane (Toonen et al., 2005). Dans les cellules neuroendocrines, il a été montré qu'une étroite coopération entre la myosine Va et la protéine MyRIP est également nécessaire au bon déroulement de l'arrimage (Desnos et al., 2007a, Desnos et al., 2007b, Huet et al., 2012). La complexine est aussi impliquée lors de cette étape. Capable de lier le complexe SNARE partiellement assemblé, elle empêche son association complète et empêche donc la fusion des membranes vésiculaires et plasmiques (Giraudo et al., 2006) (**Figure 7**).

### c) L'étape d'amorçage

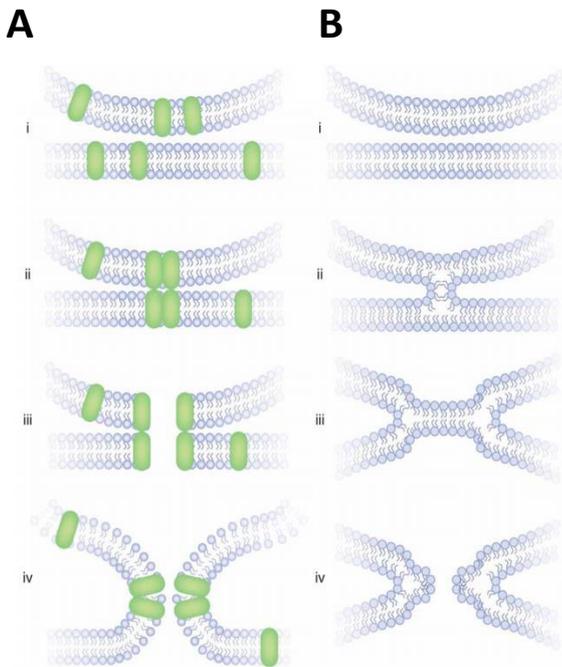
L'amorçage permet aux granules de sécrétion de devenir compétents pour la fusion. Les protéines Munc13 et Munc18 régulent cette étape car elles sont capables d'interagir avec la syntaxine-1 et de modifier sa conformation (Sugita, 2008). Munc13-1 est présente à la membrane plasmique au niveau de la zone active *via* sa liaison avec la protéine Rim (Betz et al., 2001). Dans un premier temps, Munc18-1 lie la syntaxine-1 en conformation fermée (Dulubova et al., 1999). Puis, lorsque le granule s'arrime à la membrane, Munc13-1, interagit à son tour avec ce complexe et va déplacer la protéine Munc18-1 puisque le site de liaison de Munc13-1 sur la syntaxine-1 chevauche celui de Munc18-1. Les deux protéines sont donc en compétition et agissent séquentiellement avec la syntaxine-1 (Betz et al., 1997). La liaison de Munc13-1 avec la syntaxine-1 induit un changement de conformation, engendrant l'assemblage du complexe SNARE (Sassa et al., 1999, Ma et al., 2011). Munc18-1 pourrait alors stabiliser le complexe SNARE et empêcher sa dissociation puisque Munc18-1 est également capable d'interagir avec la forme "active" de la syntaxine-1 au sein du complexe SNARE ainsi qu'avec la SNAP-25 (Hata et al., 1993, Dulubova et al., 2007, Rizo et Sudhof, 2012).

À proximité du site d'exocytose se trouve également une protéine jouant un rôle de senseur de calcique, la synaptotagmine. Cette famille de protéines contient deux domaines de type C2 capables de lier le calcium, mais également des sites de liaison aux lipides. Lors d'une augmentation de la concentration calcique, la synaptotagmine est capable de déplacer la complexine qui empêche l'association complète du complexe SNARE, ce qui permet l'amorçage du granule à la membrane (**Figure 8**) (Giraudo et al., 2006).



**Figure 8 : La passage de l'étape d'arrimage à l'amorçage.**

La protéine Munc18-1 interagit avec la syntaxine-1 et la stabilise en conformation fermée. Lorsque RIM entre en contact avec son effecteur Rab3A, la protéine Munc13-1 interagit à son tour avec la syntaxine-1, qui adopte alors une conformation ouverte, induisant l'assemblage du complexe SNARE. En présence de calcium, la synaptotagmine déplace la complexine, pour permettre l'assemblage du complexe SNARE, rendant les granules compétents pour l'étape de fusion.



**Figure 9 : Les deux modèles de fusion membranaire.**

**A. Modèle protéique.** Des protéines capables de former un pore de fusion sont localisées au niveau des membranes vésiculaire et plasmique (i). Elles s'associent pour former un pore en configuration fermé (ii). Un changement conformationnel de ce complexe permet l'ouverture du pore (iii). Les deux bicouches lipidiques fusionnent alors entre elles (iv).

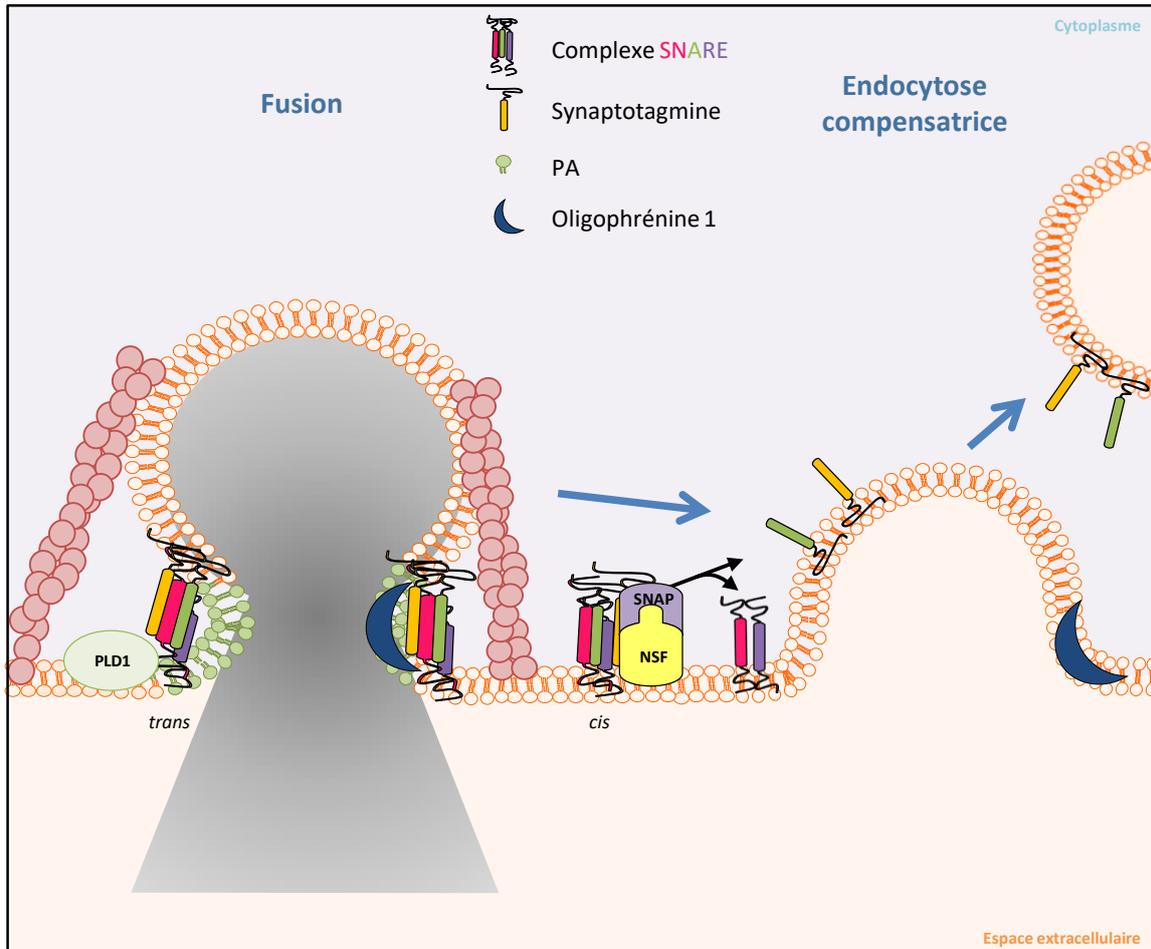
**B. Modèle lipidique.** Les membranes vésiculaire et plasmique se rapprochent (grâce à des forces exercées par les protéines) (i). Initiation de l'hémifusion des deux membranes par la formation d'une tige (ii). Les feuillettes externes s'écartent et les feuillettes internes forment une nouvelle bicouche, la membrane d'hémifusion (iii). Formation d'un pore dans la membrane nouvellement formée (iv).

(D'après Jackson et Chapman, 2008)

#### d) La fusion avec la membrane plasmique

La première étape du processus de fusion est la mise en place d'un pore de fusion. Un débat réside toujours au sein de la communauté scientifique quant à la nature de ce pore, purement lipidique ou protéo-lipidique (**Figure 9**) (Jackson et Chapman, 2006, 2008). Suite à l'expansion du pore de fusion, les membranes granulaire et plasmique vont fusionner, permettant alors la libération du contenu des granules de sécrétion dans l'espace extracellulaire. Il existe deux types de fusion : la fusion complète, si la totalité de la membrane du granule s'insère dans la membrane plasmique, et la cavapture, si la fusion de la membrane granulaire est incomplète (Harata et al., 2006). Au cours de ce mode de fusion, le pore s'ouvre très rapidement puis se referme, conduisant à la libération partielle du contenu du granule. Ceci permet à la cellule de sécréter sélectivement certaines molécules ; en l'occurrence, il n'y aura que les plus petites (comme les catécholamines) qui pourront être sécrétées par ce mode de fusion. C'est la quantité de calcium, *via* l'intensité et la fréquence de stimulation, qui dicte à la cellule le mode de fusion à utiliser, lui permettant d'adapter sa réponse en fonction des situations (Elhamdani et al., 2006).

La synaptotagmine joue également un rôle clé dans la mise en place du pore de fusion (Marqueze et al., 2000). Sa liaison permet aux domaines N-terminal des différentes protéines SNARE d'entrer en contact pour former un paquet de 4 hélices  $\alpha$  parallèles, la SNAP-25 possédant deux domaines  $\alpha$  dans sa structure (Sutton et al., 1998). Cet empaquetage va continuer et progresser jusqu'à la partie C-terminale des SNARE, en contact avec leur membrane respective. C'est cette "fermeture" du complexe qui va libérer l'énergie nécessaire pour initier la fusion membranaire (Li et al., 2007). Après la fusion, le complexe SNARE réside dans la membrane plasmique où il sera désassemblé par l'ATPase NSF (N-ethylmaleimide-Sensitive Factor) et son cofacteur SNAP (Soluble NSF Attachment Proteins), responsable du recyclage des différents acteurs de la sécrétion, afin qu'ils puissent à nouveau prendre part à un cycle de fusion membranaire (Burgoyne et Morgan, 2003).



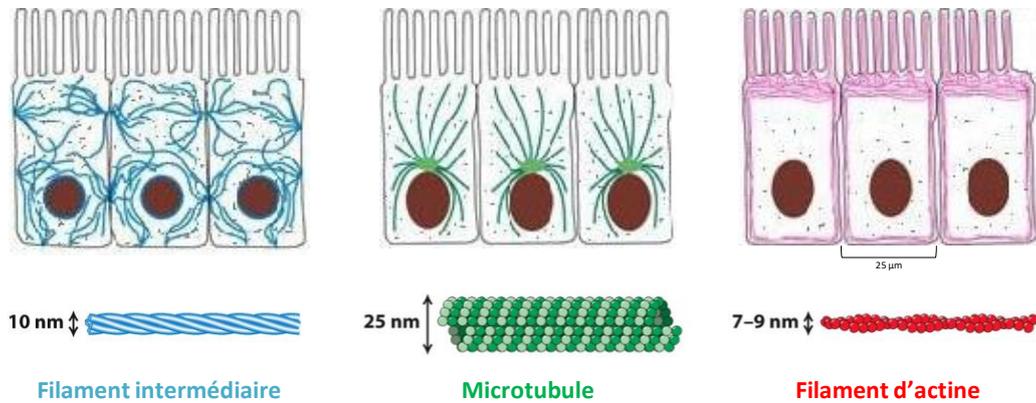
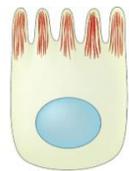
**Figure 10 : Les acteurs impliqués lors de la fusion.**

La formation du pore de fusion nécessite une synthèse de PA par la PLD1. C'est l'accumulation locale de PA qui agit sur la courbure membranaire et l'énergie libérée par l'assemblage du complexe SNARE qui permet l'ouverture du pore de fusion et la libération du contenu granulaire dans l'espace extracellulaire. Après l'étape de fusion, le complexe SNARE sera présent en conformation *cis* dans la membrane plasmique. L'intervention de l'ATPase NSF et de son cofacteur SNAP est nécessaire pour dissocier le complexe SNARE et permettre son recyclage. L'oligophrénine 1 permet de coupler les processus d'exocytose et d'endocytose.

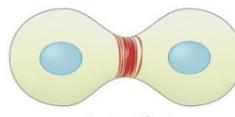
L'environnement lipidique dans lequel se trouvent les protéines SNARE va également influencer leur fonctionnement et la fusion (Salaun et al., 2005). L'acide phosphatidique (PA) est un lipide fusogénique qui est impliqué dans le processus de fusion (Humeau et al., 2001, Vitale et al., 2001, Chasserot-Golaz et al., 2010). Il est synthétisé par la phospholipase D1 (PLD1), à partir d'un autre lipide membranaire, la phosphatidylcholine. L'activation de la PLD1 nécessite la coopération entre différentes GTPases comme RalA, Arf6 et Rac1 (Bader et Vitale, 2009). La synthèse et l'accumulation locale de PA au niveau du site de fusion pourraient permettre au complexe SNARE de finaliser la fusion membranaire (**Figure 10**). Le PA est en effet capable de modifier la topologie membranaire et d'induire une courbure négative du feuillet interne de la membrane (Kooijman et al., 2005) pour permettre l'hémifusion des membranes granulaire et plasmique et promouvoir l'ouverture du pore de fusion (Bader et Vitale, 2009, Ammar et al., 2013).

Un autre acteur également impliqué lors de l'expansion du pore de fusion est le cytosquelette d'actine, qui fera l'objet du prochain paragraphe (Larina et al., 2007, Chan et al., 2010). L'actine peut réguler l'ouverture du pore de fusion en modifiant la tension membranaire *via* son interaction avec la protéine Cdc42 (Bretou et al., 2014) et/ou l'expansion du pore *via* son interaction avec la myosine II. En effet, l'actine permet d'exercer des forces mécaniques sur le granule pour accélérer la dissociation des catécholamines de la matrice intragranulaire et faciliter la libération du contenu granulaire (Doreian et al., 2008, Berberian et al., 2009). De plus, la dynamine 2, en s'associant avec l'actine, régule aussi l'expansion du pore de fusion et la quantité d'hormones libérée (Gonzalez-Jamett et al., 2013).

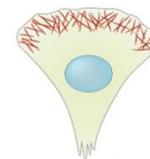
Finalement, pour compenser l'apport de membrane et maintenir une surface cellulaire constante, l'exocytose régulée est couplée au processus d'endocytose compensatrice (Houy et al., 2013). Lors de ce mécanisme opposé, la membrane plasmique bourgeonne vers l'intérieur de la cellule et forme des vésicules qui permettent d'éliminer l'excès de membrane et de recycler les composés impliqués dans la machinerie d'exocytose. L'oligophrenine 1, une protéine bi-fonctionnelle aux multiples domaines, est impliquée à la fois dans les processus d'exocytose et d'endocytose compensatrice. Elle assure le couplage entre les deux processus en agissant à la fois sur la dynamique du pore de fusion et sur la recapture de la membrane granulaire (Houy et al., 2015).

**A****B****Faisceaux parallèles serrés**

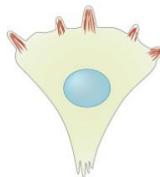
Microvillosités

**Faisceaux contractiles**

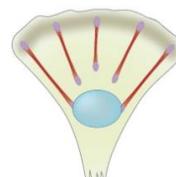
Anneau contractile

**Réseau en maille**

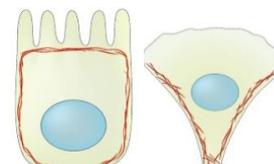
Lamellipodes



Filipodes



Fibres de stress



Cortex cellulaire

**Figure 11 : Les différents éléments du cytosquelette.****A. Structure schématique.** D'après *Molecular Cell Biology, Sixth Edition, 2008.*Source : [http://mpronovost.profweb.ca/BIONP1/bionp1\\_cellule.html](http://mpronovost.profweb.ca/BIONP1/bionp1_cellule.html)**B. Organisation du cytosquelette d'actine.**

Les filaments d'actine peuvent être organisés selon trois types d'arrangements. Dans les microvillosités et les filopodes, on trouve des faisceaux parallèles serrés, où tous les filaments sont orientés avec la même polarité. L'actine peut également former des faisceaux contractiles, où les filaments sont disposés avec des polarités opposés comme dans les fibres de stress ou au niveau de l'anneau contractile. C'est la présence de moteurs moléculaires entre les filaments qui permet de créer une force de contraction. L'actine forme également un réseau en maille dans les lamellipodes et dans le réseau sous-membranaire cortical. Les filaments y forment un arrangement lâche mais avec de nombreuses interconnexions orthogonales.

Source : <http://www.mechanobio.info/topics/cytoskeleton-dynamics/cytoskeleton/actin-filament/>

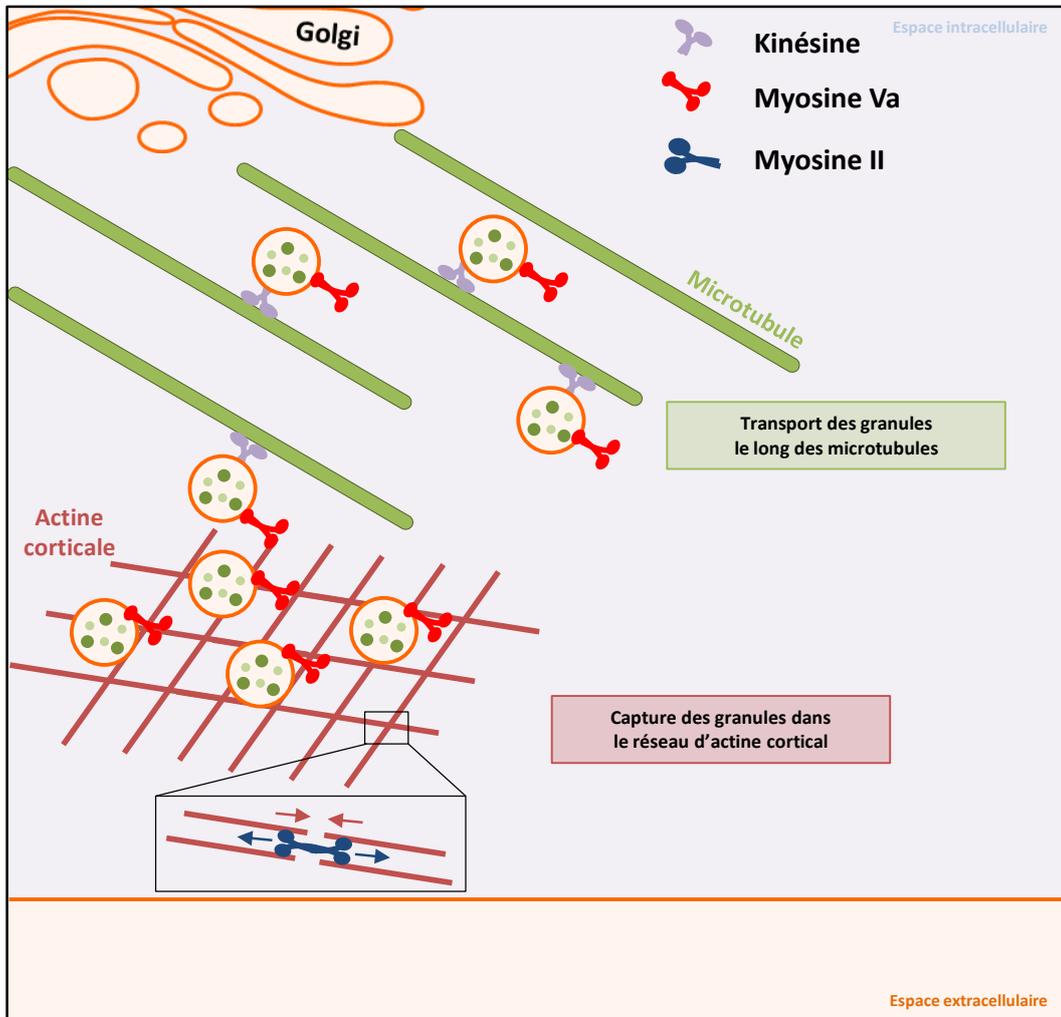
## 5) Zoom sur le rôle du cytosquelette au cours de l'exocytose

Les mécanismes moléculaires qui régissent l'exocytose régulée sont très complexes et impliquent une multitude d'interactions entre différentes protéines. La régulation fine et précise de ces interactions est donc cruciale pour permettre le bon déroulement de chaque étape de l'exocytose et nécessite une coopération étroite avec les éléments du cytosquelette.

### a) Présentation du cytosquelette

Le cytosquelette cellulaire est composé de 3 éléments : les filaments intermédiaires, les microtubules et l'actine (**Figure 11, A**). Les filaments intermédiaires sont des structures fibrillaires exprimées de façon hétérogène dans les différents types cellulaires. Ce sont les éléments les plus stables du cytosquelette, qui permettent de maintenir la forme de la cellule et d'ancrer les organites cellulaires. Les microtubules sont des fibres creuses, composées d'une protéine globulaire, la tubuline. Ces structures dynamiques alternent entre des phases de polymérisation et de dépolymérisation, ce qui leur permet de jouer un rôle dans le déplacement des vésicules ou des organites et lors de la migration des chromosomes au cours de la mitose. Enfin, l'actine existe sous forme monomérique (actine-G) ou filamenteuse (actine-F). L'association de monomères d'actine engendre la formation de filaments qui peuvent alors s'assembler en faisceaux d'actine. Le cytosquelette d'actine intervient notamment dans les processus de remodelage membranaire et de mobilité cellulaire.

Selon les processus dans lesquels ils sont impliqués, les filaments d'actine vont s'organiser de différentes manières dans les cellules (**Figure 11, B**). Les filaments peuvent être organisés en faisceaux parallèles serrés, comme dans les microvillosités des cellules intestinales ou dans les filopodes, projections cytoplasmiques retrouvées sur le bord des cellules en migration. L'actine peut également former des faisceaux contractiles dans les cellules musculaires ou au niveau de l'anneau contractile qui sépare deux cellules en division. Au cours de l'internalisation de vésicules, elle permet également de faciliter le processus de scission. Au niveau des points d'adhésion à la matrice extracellulaire, les faisceaux contractiles forment des fibres de stress. C'est grâce à des moteurs moléculaires



**Figure 12 : Rôle du cytosquelette dans le transport des granules de sécrétion.**

Après leur synthèse au niveau du TGN, les granules de sécrétion sont acheminés vers la périphérie cellulaire le long des microtubules, *via* les kinésines. Ils sont ensuite transférés vers le cytosquelette d'actine corticale où les myosines II et Va contrôlent et restreignent leur mobilité.

comme les myosines que la contraction de ces fibres génère une force de tension qui permet à la cellule de moduler ses interactions avec la matrice extracellulaire lors des processus d'adhérence et de migration. Le réseau d'actine peut également s'organiser en maille, comme dans les lamellipodes ou dans le réseau d'actine cortical sous-membranaire. La polymérisation du cytosquelette d'actine permet de réguler les déplacements et les mouvements cytoplasmiques des granules de sécrétion et des endosomes.

Dans les prochains paragraphes, je m'intéresserai aux deux éléments du cytosquelette qui entrent en jeu au cours du processus d'exocytose, à savoir les microtubules et le réseau d'actine, qui participent au transport des granules de sécrétion et à leur capture dans le réseau cortical. J'aborderai ensuite la dynamique du cytosquelette d'actine au niveau du site d'exocytose.

## **b) Rôle du cytosquelette dans l'exocytose**

Dans les cellules chromaffines, le cytosquelette d'actine est principalement distribué à la périphérie cellulaire. Les microtubules sont également présents à la périphérie mais forment un réseau moins dense : ils sont essentiellement localisés dans le cytoplasme (Trifaro et al., 2008).

### **i. Transport des granules de sécrétion**

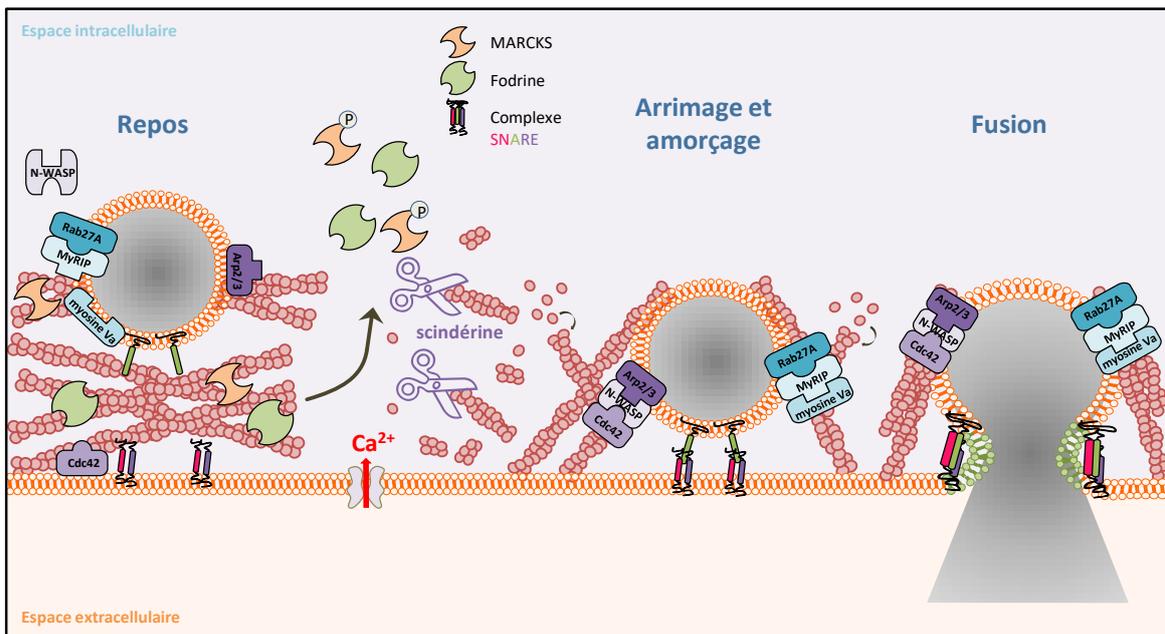
Après leur synthèse au niveau du TGN, les granules de sécrétion doivent être acheminés à la membrane plasmique. Leur transport le long des structures du cytosquelette est assuré par des moteurs moléculaires de transport : les kinésines pour les microtubules et les myosines pour les filaments d'actine (Brown, 1999). L'utilisation de différentes drogues a permis de mettre en évidence le rôle de ces structures (Neco et al., 2003). Les drogues agissant sur les microtubules affectent uniquement le transport péri-nucléaire des granules de sécrétion, sans affecter leur mobilité corticale, et ont un impact mineur sur la sécrétion. Ces observations suggèrent que les microtubules jouent un rôle dans le transport des vésicules entre l'appareil de Golgi et la périphérie cellulaire (**Figure 12**) (Rudolf et al., 2001). Lorsque les vésicules arrivent à la périphérie cellulaire, un transfert s'effectue des microtubules vers les filaments d'actine, nécessitant la coopération entre les différents moteurs moléculaires (DePina et Langford, 1999, Desnos et al., 2007a). Cette coordination

entre les microtubules et les filaments d'actine est indispensable au bon déroulement du processus d'exocytose (Neco et al., 2003).

Des moteurs moléculaires comme les myosines sont capables de contrôler et d'influencer la dynamique du cytosquelette d'actine. Deux classes de myosines présentes dans les cellules chromaffines y participent : les myosines II et Va (Neco et al., 2002). La myosine II est présente à la périphérie cellulaire et colocalise avec l'actine corticale alors que la myosine Va est associée aux granules de sécrétion dans le cytoplasme (Rose et al., 2003, Desnos et al., 2007b). La myosine II participe ainsi au mouvement des granules et régule leur accès à la membrane plasmique. L'expression d'un mutant inactif de la myosine II (Neco et al., 2004) et la présence d'inhibiteurs de la myosine II (Neco et al., 2002) restreignent le mouvement des granules de sécrétion dans le réseau d'actine cortical. Certaines protéines présentes sur les granules de sécrétion, telles que Rab27 et MyRIP, interagissent avec à la myosine Va pour contrôler les interactions granules/actine (Desnos et al., 2003). En se déplaçant sur les filaments d'actine, la myosine Va régule la distribution et le mouvement des granules de sécrétion au sein du cytosquelette d'actine cortical (Rudolf et al., 2003, Desnos et al., 2007b). Elle est également impliquée dans le transport des granules le long des filaments d'actine entre le pool de réserve et la membrane plasmique (Rose et al., 2003).

## **ii. La barrière d'actine corticale**

Dans les cellules chromaffines, un dense réseau d'actine est présent en continuité à la périphérie cellulaire. Il forme une barrière physique empêchant les granules d'accéder à la membrane plasmique (Aunis et Bader, 1988). La fodrine est impliquée dans la structuration du cytosquelette d'actine (Perrin et Aunis, 1985). Cette protéine est capable de relier plusieurs filaments d'actine entre eux lorsque la concentration de calcium est faible. La protéine MARCKS participe elle aussi au maintien de cette barrière en rapprochant les filaments d'actine (Hartwig et al., 1992). Au cours du processus de sécrétion, la barrière du cytosquelette d'actine va subir une réorganisation dynamique. En effet, pour qu'il y ait exocytose, il faut que les granules de sécrétion accèdent à la membrane plasmique. Des marquages immunocytochimiques, à l'aide de la phalloïdine couplée à la rhodamine, ont permis de mettre en évidence qu'après une stimulation nicotinique, le cytosquelette d'actine est rapidement désassemblé pour permettre aux granules d'accéder aux sites



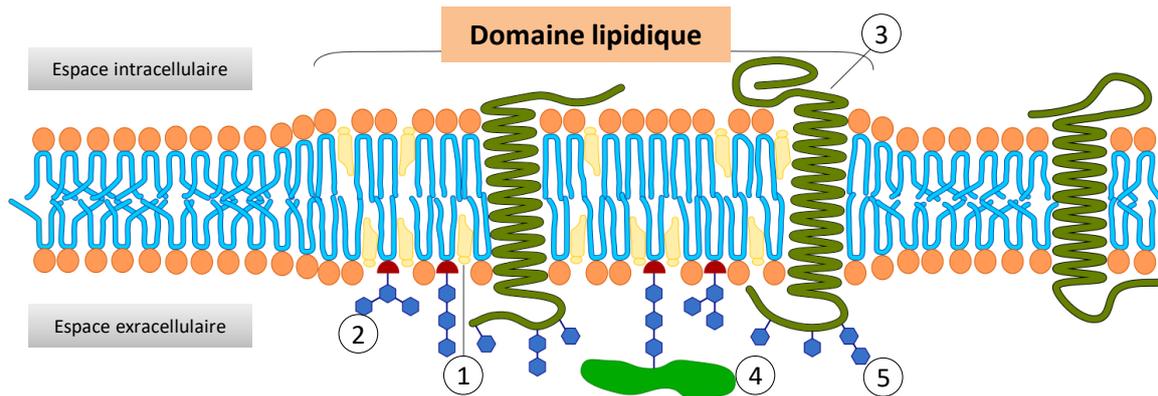
**Figure 13 : Réorganisation du cytosquelette d'actine au cours du processus d'exocytose.**

Dans les cellules au repos les granules ne peuvent pas accéder à la membrane plasmique car ils sont retenus dans une dense barrière d'actine. Son maintien est assuré par des protéines telles que la fodrine ou MARCKS, capables de resserrer les filaments d'actine entre eux. Lors d'une stimulation, l'entrée de calcium induit l'activation de la scindérine capable de cliver les filaments d'actine et de dissocier le réseau. Des nouveaux filaments d'actine sont également synthétisés au niveau du granule arrimé, *via* les complexes Cdc42-Arp2/3 et Rab27A-MyRIP-myosine Va, afin de contribuer à la structuration du site d'exocytose et au processus de fusion.

d'arrimage (Cheek et Burgoyne, 1986). Cette réorganisation est contrôlée par la concentration de calcium intracellulaire et par diverses protéines interagissant avec le réseau d'actine comme par exemple la scindérine (Rodriguez Del Castillo et al., 1990). Localisée à la périphérie des cellules neuroendocrines, la scindérine forme des agrégats au niveau de l'actine-F, qu'elle clive en petits fragments lors d'une stimulation (Vitale et al., 1991). L'entrée de calcium provoque aussi la dissociation de la fodrine des filaments d'actine. Parallèlement, MARCKS est phosphorylée par la protéine kinase C (PKC), ce qui la rend incapable de lier les filaments d'actine et participe à la dissociation du réseau cortical d'actine.

### iii. Dynamique du cytosquelette d'actine au niveau du site d'exocytose

Longtemps le rôle de "barrière" a été le seul considéré pour le cytosquelette d'actine au cours de l'exocytose mais, depuis quelques années, de plus en plus d'études ont mis en évidence un rôle actif de l'actine au cours de ce processus (Gutierrez, 2012). En effet, lors d'une stimulation, parallèlement à la dépolymérisation du cytosquelette d'actine cortical, de nouveaux filaments d'actine sont également formés au niveau des sites d'exocytose pour permettre une sécrétion plus efficace. Des acteurs comme Rac1 et Cdc42 de la famille des Rho GTPases sont impliqués dans cette néosynthèse. L'expression de mutants constitutivement actifs (liés au GTP) de Rac1 (Rac1L61) ou de Cdc42 (Cdc42L61) induit une augmentation de la sécrétion neuroendocrine (Li et al., 2003, Gasman et al., 2004) et l'expression du mutant constitutivement actif de Cdc42 augmente également la quantité d'actine polymérisée à la périphérie cellulaire. Dans les cellules au repos, Cdc42 est membranaire alors que son partenaire, N-WASP, est cytosolique et qu'Arp2/3 est associée aux granules de sécrétion. Le déclenchement du processus d'exocytose active Cdc42, qui recrute alors N-WASP à la membrane plasmique. Les granules de sécrétion s'arriment à cet endroit, Arp2/3 s'associe avec ses effecteurs. Ce complexe agit alors comme site de nucléation pour former des nouveaux filaments d'actine au niveau des sites actifs d'exocytose (Gasman et al., 2004). D'autres acteurs comme Rab27 et MyRIP, capables d'affecter la dynamique du cytosquelette d'actine, jouent également un rôle dans ce processus (**Figure 13**) (Desnos et al., 2003).



**Figure 14 : Structure des microdomaines lipidiques.**

Au sein de la membrane plasmique, les domaines lipidiques sont enrichis en cholestérol (1) et en glycolipides (2) mais également en protéines transmembranaires (3) et à ancrage GPI (4) qui subissent des modifications par glycosylation (5).

Source : <http://www.ulisboa.pt/wp-content/uploads/Clipping/Atomium-Culture.pdf>

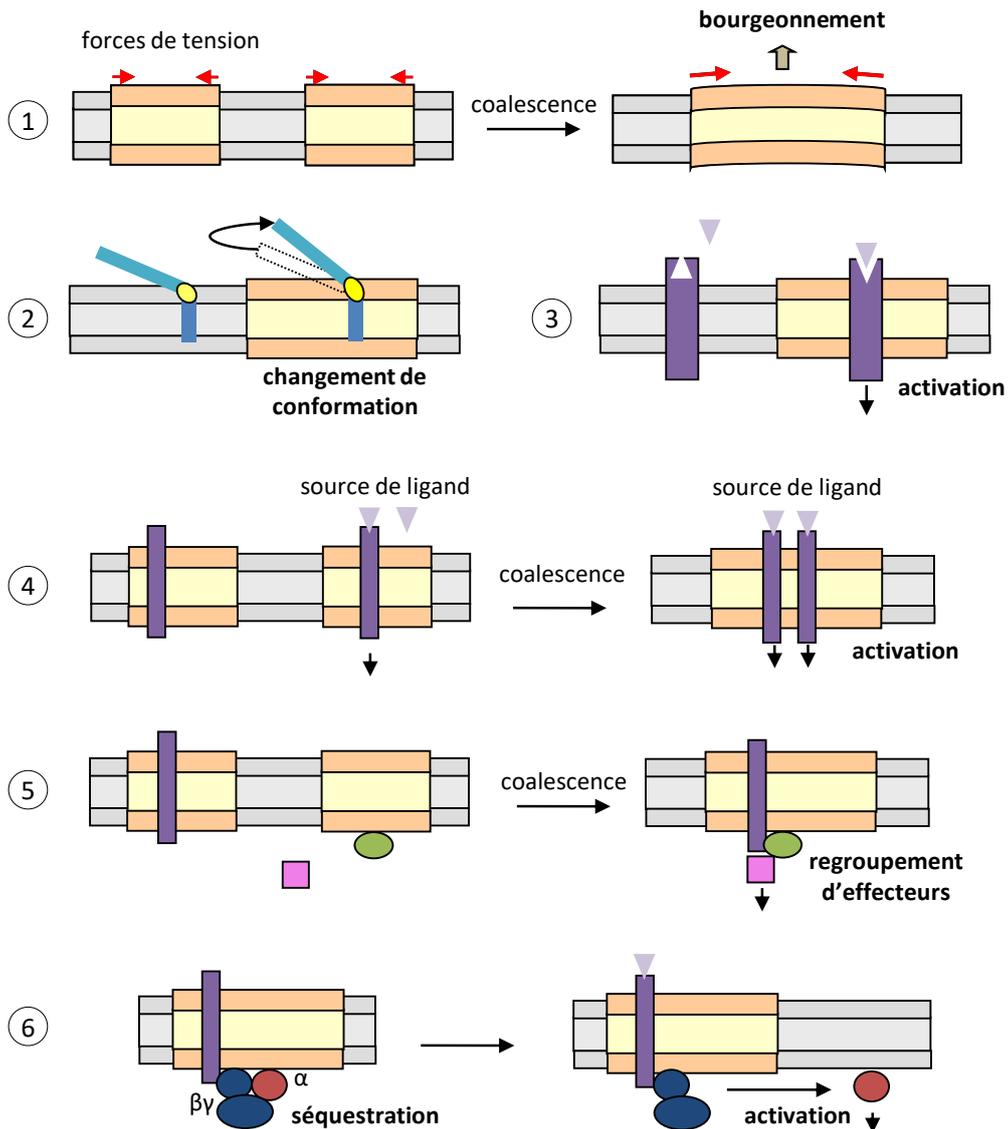
Le rôle précis de ces filaments néoformés n'est pas clairement établi : ils pourraient permettre une délimitation spatiale du site d'arrimage pour rendre ce processus plus efficace et/ou générer une force de compression sur les granules et contribuer à la délivrance de leur contenu (Neco et al., 2004). Une autre hypothèse serait l'implication de ces nouveaux filaments d'actine dans la régulation des deux modes de fusion (cavcapture/fusion totale) et/ou dans le couplage entre l'exocytose et l'endocytose (Jeng et Welch, 2001, Malacombe et al., 2006).

## 6) Le site d'exocytose, une plateforme lipidique dynamique

Le processus d'exocytose nécessite l'intervention de multiples acteurs, d'origine lipidique et protéique, interagissant les uns avec les autres, et avec le cytosquelette. Le bon déroulement de ce mécanisme finement organisé nécessite aussi une régulation spatiotemporelle très stricte. En effet, il faut coordonner la mise en place de tous les acteurs (protéines, cytosquelette, granule de sécrétion...) au bon endroit et au bon moment. Cela nécessite la mise en place d'un site hautement régulé où les multiples partenaires peuvent interagir. L'organisation de domaines lipidiques spécialisés au sein même de la membrane plasmique pourrait permettre de donner une réalité physique au site d'exocytose puisqu'en effet, ces domaines permettent de regrouper des protéines à des endroits donnés de la membrane (Salaun et al., 2004).

### a) Caractéristiques des domaines lipidiques

Les microdomaines lipidiques sont issus de la coalescence de petits domaines très dynamiques (de 10-200 nm) enrichis en sphingolipides et en stérols. Ils sont capables de compartimentaliser les processus cellulaires (Pike, 2006). Ces plateformes lipidiques forment une population très hétérogène car leur composition est variable et propre à chaque type cellulaire. Ces radeaux possèdent tout de même des caractéristiques communes comme un enrichissement en cholestérol, en sphingolipides (comme en sphingomyéline et en gangliosides tel que le GM1) ainsi qu'en protéines à ancrage GPI (**Figure 14**) (Pike, 2003). Cette composition lipidique particulière confère à ces domaines des propriétés physicochimiques spécifiques, qui les rendent résistants à la solubilisation par des



**Figure 15 : Les modes d'action des microdomaines lipidiques.**

Les nano- et microdomaines lipidiques sont représentés en orangé et la bicouche lipidique environnante en gris. Les forces de tension de ligne exercées à l'interface entre les domaines lipidiques et la membrane avoisinante diminuent lors de leur coalescence, permettant leur bourgeoisement (1). La présence d'une protéine au sein d'un radeau lipidique peut induire son changement de conformation (2). Quand un récepteur (violet foncé) est localisé dans les domaines lipidiques, la liaison de son ligand (violet clair) est modifiée, affectant ses capacités d'activation (3). La coalescence de nanodomaines en microdomaines permet de former des agrégats de récepteurs pour augmenter la signalisation (4) ou de regrouper des complexes de signalisation (vert et rose). Exemple de régulation négative : les domaines lipidiques séquestrent des protéines G hétéotrimériques. Sous l'effet d'une stimulation du récepteur, la sous-unité  $\alpha$  est dissociée et exerce son action hors des radeaux lipidiques (6).

Source: Thèse Umbrecht-Jenck, 2008

détergents non-ioniques (comme au Triton X-100 à 4°C) (Simons et Ikonen, 1997). Il est possible de détecter *in situ* les domaines lipidiques en utilisant la sous-unité  $\beta$  de la toxine cholérique (CTX) couplée à un fluorochrome car elle est capable de lier 5 molécules de GM1 (Arosio et al., 2004). Les microdomaines lipidiques formés dans les cellules chromaffines sont également enrichis en PIP<sub>2</sub> (Umbrecht-Jenck et al., 2010). Ce lipide est préférentiellement présent dans le feuillet interne de la membrane plasmique et joue un rôle critique dans différents processus cellulaires comme la régulation dynamique des filaments d'actine (Moss, 2012). Le PIP<sub>2</sub> a également un rôle primordial au cours des différentes étapes de l'exocytose (Gong et al., 2005, Martin, 2012).

## **b) Rôle des microdomaines lipidiques**

### **i. Effet physique sur la membrane plasmique**

Les plateformes lipidiques vont tout d'abord avoir un effet "physique" sur la membrane. Elles créent localement un environnement dense en charges où la fluidité est réduite. Lors de la formation des domaines lipidiques, leur regroupement permet de diminuer la tension exercée avec la membrane avoisinante et ainsi de moduler la courbure membranaire (Schuck et Simons, 2004). Les microdomaines lipidiques possèdent également une épaisseur légèrement plus importante que la bicouche lipidique environnante (Rukmini et al., 2001).

### **ii. Régulation de la localisation des protéines**

Cette organisation lipidique spécifique au sein de la membrane régule de nombreuses interactions et permet de contrôler la localisation et l'activité de certaines protéines (**Figure 15**).

#### **- Recrutement de protéines à la membrane**

Au cours de multiples processus cellulaires, certaines protéines doivent être recrutées au niveau des microdomaines lipidiques. Par exemple, la stimulation des cellules astrocytaires provoque le recrutement de la phospholipase C- $\beta$ 1 et de la PKC $\alpha$  au niveau des radeaux lipidiques (Weerth et al., 2007). Dans les cellules lymphocytaires, suite à l'activation des TCR (T-cell-receptor), la phospholipase C- $\gamma$ 1 doit être recrutée au niveau des

microdomaines lipidiques où elle sera activée (Veri et al., 2001).

- ***Concentration ou exclusion de certaines molécules***

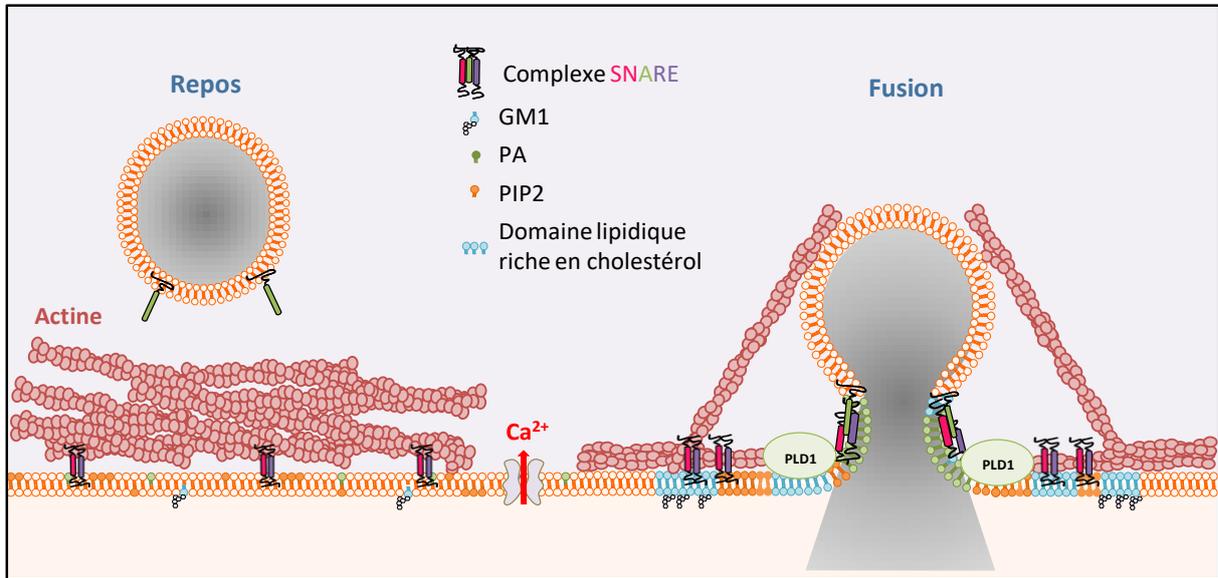
Les radeaux lipidiques créent des zones où certaines protéines peuvent être sélectivement concentrées ou exclues (Simons et Ikonen, 1997). Ces domaines lipidiques permettent de concentrer des récepteurs et leurs ligands, ou encore des molécules de signalisation et leurs effecteurs, afin de rendre la signalisation plus rapide et plus efficace. Les plateformes lipidiques favorisent aussi l'assemblage et la formation de complexes multimoléculaires. À la jonction neuromusculaire par exemple, l'agrégation des récepteurs à l'acétylcholine au sein des domaines lipidiques permet une meilleure réception du signal (Zhu et al., 2006). Le rassemblement de récepteurs permet d'amplifier un signal et par conséquent, de moduler la signalisation intracellulaire qu'ils induisent. À l'inverse, dans les cellules lymphocytaires, la PLD1 doit être localisée hors des domaines lipidiques pour être stimulée (Diaz et al., 2005).

**iii. Modulation de l'activité protéique**

Les domaines lipidiques influence également l'activité des protéines qui s'y trouvent. Par exemple, la syntaxine-1 possède un domaine flexible, qui se rigidifie lorsqu'elle est localisée dans un radeau lipidique, ce qui a un effet positif sur la fusion membranaire (Knecht et Grubmuller, 2003, Salaun et al., 2004). Une réduction de cholestérol, de sphingomyéline ou des gangliosides dans la membrane plasmique altère la réception du signal par les récepteurs sérotoninergiques 5HT7. De même que les récepteurs 5HT7, localisés dans des domaines lipidiques, ont une meilleure affinité pour leur ligand, ce qui rend la signalisation cellulaire plus efficace (Sjogren et al., 2006, Sjogren et Svenningsson, 2007).

**iv. Rôle dans le processus d'exocytose**

Au cours du processus de sécrétion, les microdomaines jouent de multiples rôles. La présence de domaines lipidiques au niveau du site d'exocytose permet de concentrer les composants essentiels de la machinerie sécrétrice et d'influencer la courbure membranaire pour favoriser le processus de fusion (van Meer et Sprong, 2004, Lang, 2007). Par exemple, des protéines SNARE comme la syntaxine-1A et la SNAP-25 sont enrichies jusqu'à 25 fois dans les radeaux lipidiques (Chamberlain et al., 2001). Des études suggèrent également un lien fonctionnel entre les domaines enrichis en PIP<sub>2</sub> à la membrane plasmique et la présence

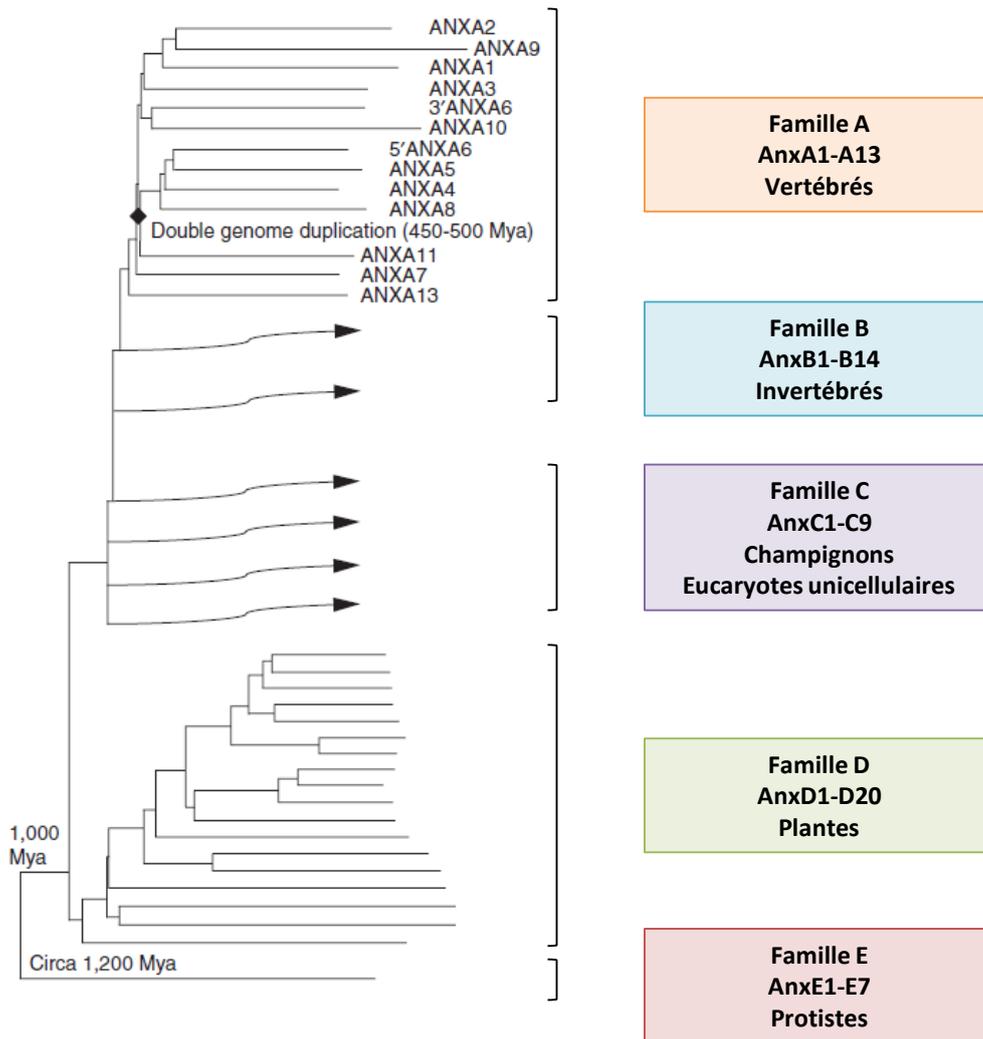


**Figure 16 : Organisation des lipides au niveau des sites d'exocytose.**

Au repos, le PIP2 et le GM1 sont répartis de façon aléatoire dans la membrane plasmique et le PA est présent sur la face cytoplasmique. Lors d'une stimulation, des domaines lipidiques, enrichis en PIP2, cholestérol et GM1 sont formés au niveau des sites d'exocytose. Ces domaines permettent de regrouper des protéines indispensables au processus d'exocytose comme les protéines SNARE. Ces plateformes lipidiques agissent également sur la tension et la courbure membranaire et, comme la synthèse locale de PA par la PLD1, participent à la mise en place du pore de fusion.

de granules arrimés/amorcés ou fusionnés à ces endroits (Aoyagi et al., 2005, James et al., 2008). Ces plateformes enrichies en PIP<sub>2</sub> pourraient permettre de regrouper et concentrer spatialement les différents acteurs nécessaires au bon déroulement du processus d'exocytose puisque de nombreuses protéines impliquées dans ce processus possèdent des domaines de liaison au PIP<sub>2</sub> (Koch et Holt, 2012, Martin, 2015). Les microdomaines lipidiques pourraient donc constituer le site d'assemblage de la machinerie de l'exocytose (**Figure 16**).

À l'heure actuelle, le mécanisme de formation de ces plateformes lipidiques n'est pas clairement connu. La formation des domaines lipidiques pourrait résulter de l'association latérale spontanée entre lipides et protéines mais l'intervention d'autres facteurs intracellulaires a également été envisagée (Simons et Toomre, 2000, Simons et Vaz, 2004). Il existe d'autres candidats possibles pour orchestrer la mise en place de ces microdomaines au niveau du site d'exocytose. En effet, des protéines capables d'entraîner la coalescence et la stabilisation de domaines lipidiques dans les membranes biologiques ont été décrites, et parmi elles, on trouve l'annexine A2 (Gokhale et al., 2005). Capable d'interagir avec de nombreux partenaires lipidiques et protéiques, nous verrons dans le chapitre suivant, comment cette protéine qui lie les phospholipides, l'actine et le calcium, intervient au cours du processus d'exocytose et dans l'organisation des domaines lipidiques.



**Figure 17 : Les différentes familles d'annexines.**  
 (D'après Moss et Morgan, 2004).

## B. Rôle de l'annexine A2 au cours de la sécrétion neuroendocrine

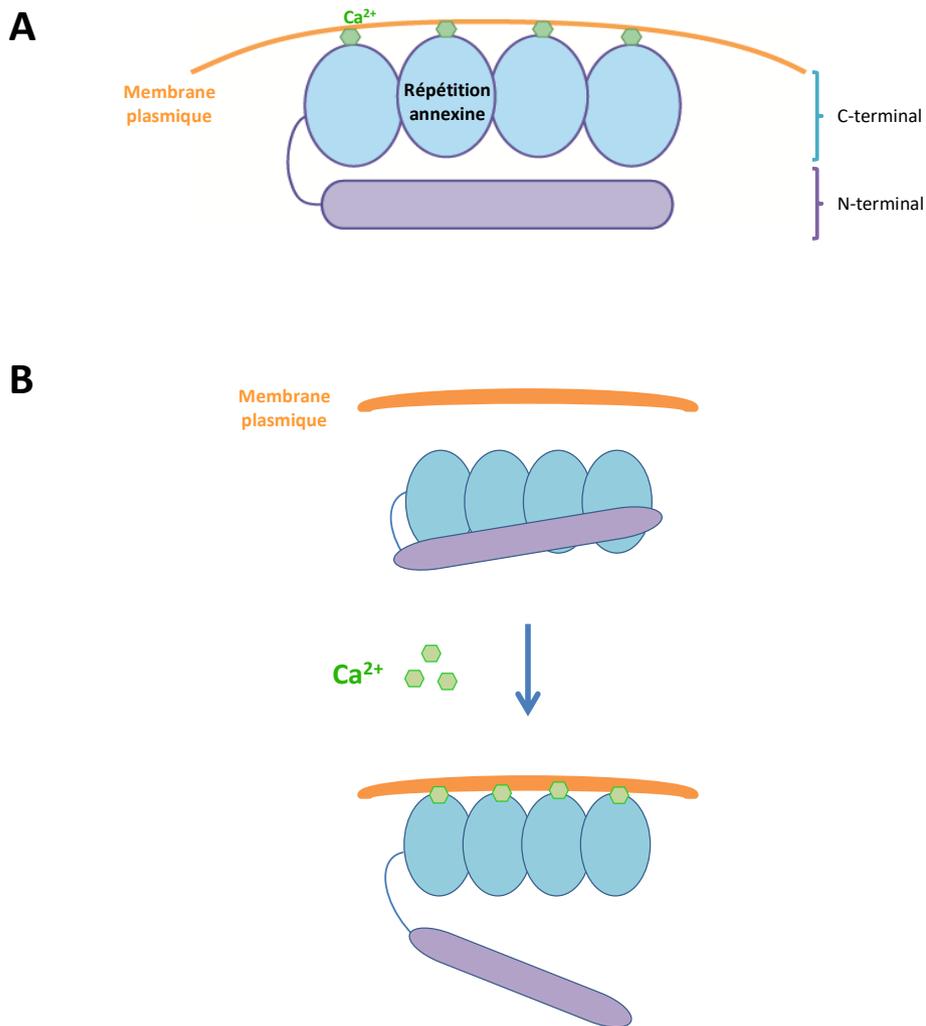
### 1) La grande famille des annexines

Les annexines forment une famille composée d'environ 160 protéines solubles et multifonctionnelles, très conservées durant l'évolution. Découvertes il y a un peu plus de 35 ans, elles sont retrouvées dans plus de 65 espèces, dans le règne animal comme végétal (Gerke et Moss, 2002). Les différentes annexines sont réparties en 5 grandes familles, selon les organismes où elles sont exprimées (**Figure 17**). La famille A, qui contient 12 membres, regroupe les annexines spécifiques aux vertébrés. Dans la famille B, on trouve les annexines présentes chez les invertébrés tandis que la famille C regroupe les annexines exprimées dans les champignons et dans certains eucaryotes unicellulaires. Les annexines des plantes constituent la famille D, et celles des protistes constituent la dernière famille, E (Moss et Morgan, 2004). La caractéristique principale des annexines est leur liaison calcium-dépendante aux phospholipides chargés négativement *via* un domaine très conservé, appelé "répétition annexine" (annexin repeat).

#### a) La structure des annexines

##### i. Le domaine C-terminal, commun à toutes les annexines

Une particularité structurale des annexines est leur partie C-terminale, hautement conservée entre les différentes familles. Également appelée domaine "cœur" (core domain), il s'agit de quatre répétitions d'un module de 70 acides aminés (à l'exception de l'annexine A6 où il est répété huit fois). Ces motifs forment une structure en hélice  $\alpha$ , très plane et compacte, qui peut être comparée à celle d'un disque légèrement incurvé. Sur la face convexe sont exposés les sites de liaison au calcium et aux lipides (**Figure 18, A**). Des différences en matière de répartition et de nombre de site de liaison donnent à chaque annexine sa sensibilité et son affinité aux différents phospholipides (Gerke et al., 2005). La face concave du domaine "cœur" quant à elle n'est pas en contact avec la membrane, et



**Figure 18 : Les annexines.**

**A. Structure générale.** Les protéines de la familles des annexines possèdent toutes un « cœur » domaine, très conservé, où se trouvent les sites de liaison aux lipides et au calcium. Le domaine N-terminal est variable entre les différentes annexines et contient des sites de liaison et de modifications post-traductionnelles propres à chaque annexine.

**B. Conformation des annexines en absence et en présence de calcium.** En absence de calcium, le domaine N-terminal est logé dans la partie C-terminale. En présence de calcium, le domaine C-terminal qui contient les sites de liaison au calcium et aux phospholipides va interagir avec la membrane. Le domaine N-terminal est alors libre et l'annexine peut interagir avec ses partenaires.

peut interagir avec la partie N-terminale de la protéine *via* des liaisons hydrophobes ou avec des partenaires cytosoliques (Gerke et Moss, 2002).

## ii. La spécificité de chaque annexine : le domaine N-terminal

La partie variable des annexines se situe en N-terminal et confère à chaque annexine des propriétés uniques (Gerke et Moss, 2002). Ces domaines N-terminal varient en termes de séquence et de longueur. C'est dans cette partie que se trouvent aussi de nombreux sites de modifications post-traductionnelles, ainsi que des sites de liaisons pour des partenaires protéiques, comme par exemple les protéines de la famille S100 (Waisman, 1995). Lorsqu'il n'y a pas ou peu de calcium, la partie N-terminale des annexines est logée dans la partie concave du domaine "cœur" (**Figure 18, B**). La présence de calcium engendre un changement de conformation de la partie C-terminale, ce qui libère le domaine N-terminal et permet aux annexines d'interagir avec des partenaires spécifiques. Ceci confère à chaque annexine un rôle distinct ainsi qu'une localisation cellulaire particulière. (Gerke et Moss, 2002).

## b) Localisations et fonctions

La localisation des annexines dépend de la nature de leurs liaisons lipidiques (PA, phosphatidylinositol, phosphatidylsérine (PS)) (Gerke et al., 2005). La plupart des annexines sont présentes sous forme soluble dans le cytoplasme des cellules et s'associent aux membranes sous l'effet d'une stimulation. Dans des cellules plaquettaires activées par exemple, l'annexine A5 est relocalisée au niveau de la membrane plasmique et du cytosquelette d'actine (Tzima et al., 1999), tout comme l'annexine A2 dans les cellules chromaffines stimulées (Chasserot-Golaz et al., 1996) ou l'annexine A6 dans les cellules musculaires en présence d'une forte concentration de calcium (Babiychuk et al., 1999). Les annexines sont donc souvent impliquées dans les liaisons membrane-cytosquelette et de ce fait, ont des rôles dans le trafic et l'organisation membranaire, comme dans les processus d'exocytose, d'endocytose et de phagocytose (Gerke et Moss, 2002). Les annexines peuvent également être responsables des liaisons entre deux membranes, puisqu'elles peuvent s'associer à diverses membranes cellulaires comme les membranes endosomales, du TGN, du réticulum endoplasmique...

Certaines annexines sont présentes dans le noyau, comme l'annexine A1, qui se lie aux acides ribonucléique (ARN) et désoxyribonucléique (ADN) (Hirata et Hirata, 1999). En interagissant à la fois avec les ARN messagers et le cytosquelette d'actine, elle joue un rôle dans le positionnement intracellulaire des messagers (Gerke et Moss, 2002). L'annexine A11 a également été identifiée dans le nucléoplasme. Lors de la division cellulaire ou d'une élévation de calcium, elle est relocalisée au niveau de l'enveloppe nucléaire où elle colocalise avec son partenaire, la protéine S100A6. Ce complexe joue un rôle dans la régulation dynamique de l'enveloppe nucléaire (Tomas et Moss, 2003).

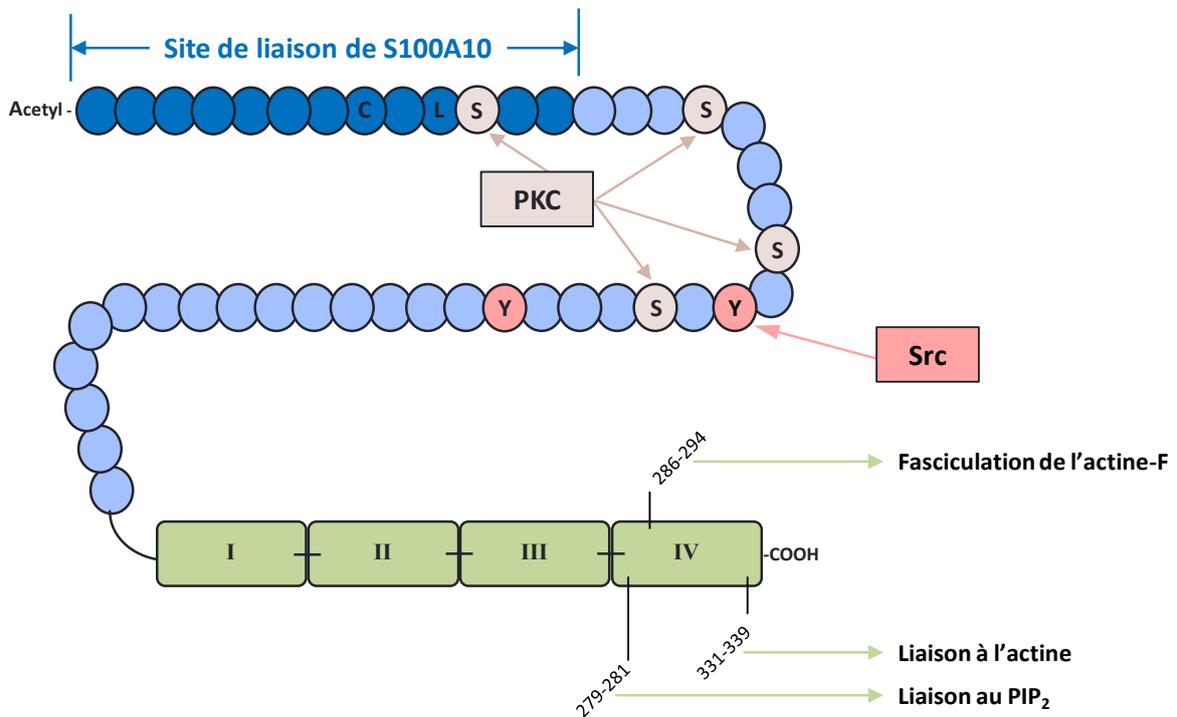
D'autres annexines ont un rôle à l'extérieur des cellules. Malgré l'absence de peptide signal, certaines annexines sont capables de traverser la membrane plasmique pour se retrouver dans l'espace extracellulaire. L'annexine A1 par exemple, a été identifiée à la surface des neutrophiles au cours du processus inflammatoire (Perretti et Gavins, 2003). L'annexine A5 quant à elle, dotée d'une activité anticoagulante, est impliquée dans le processus de thrombose (Rand, 2000). L'annexine A2 extracellulaire joue, entre autre, un rôle dans le processus de fibrinolyse à la surface des cellules endothéliales, rôle qui sera discuté plus en détails dans la quatrième partie de ce chapitre.

## **2) Focus sur l'annexine A2**

L'annexine A2 est une protéine de 36 kilodaltons, très conservée entre les espèces : on retrouve 98% d'homologie entre les séquences d'annexine A2 humaine, murine et bovine (Raynal et Pollard, 1994). Elle a longtemps été appelée calpactine I, qui lie le calcium et l'actine (Glenney, 1987) ou chromobindine 8, qui lie les granules chromaffines (Creutz et al., 1983). Dans cette partie, je décrirai les propriétés de l'annexine A2 puis ses différents rôles, en me focalisant sur ses fonctions dans le trafic membranaire et à la surface des cellules.

### **a) Particularités de l'annexine A2**

L'annexine A2 a la particularité d'interagir avec la protéine S100A10, avec qui elle forme un hétérotétramère. Elle lie également le t-PA et possède une séquence d'exportation nucléaire ainsi que de nombreux sites de phosphorylations (Eberhard et al., 2001, Flood et Hajjar, 2011). Son domaine C-terminal quant à lui contient les sites de liaison au calcium, à



**Figure 19 : Structure de l'annexine A2.**

Les principaux sites de régulation de l'annexine A2 se trouvent dans son domaine N-terminal, où on retrouve également le site de liaison pour la protéine S100A10, avec qui l'annexine A2 est capable de s'assembler en tétramère. Les sites de liaison à l'actine, aux phospholipides et au calcium se situent dans le domaine C-terminal. C : cystéine, L : lysine, S : sérine, Y : tyrosine.

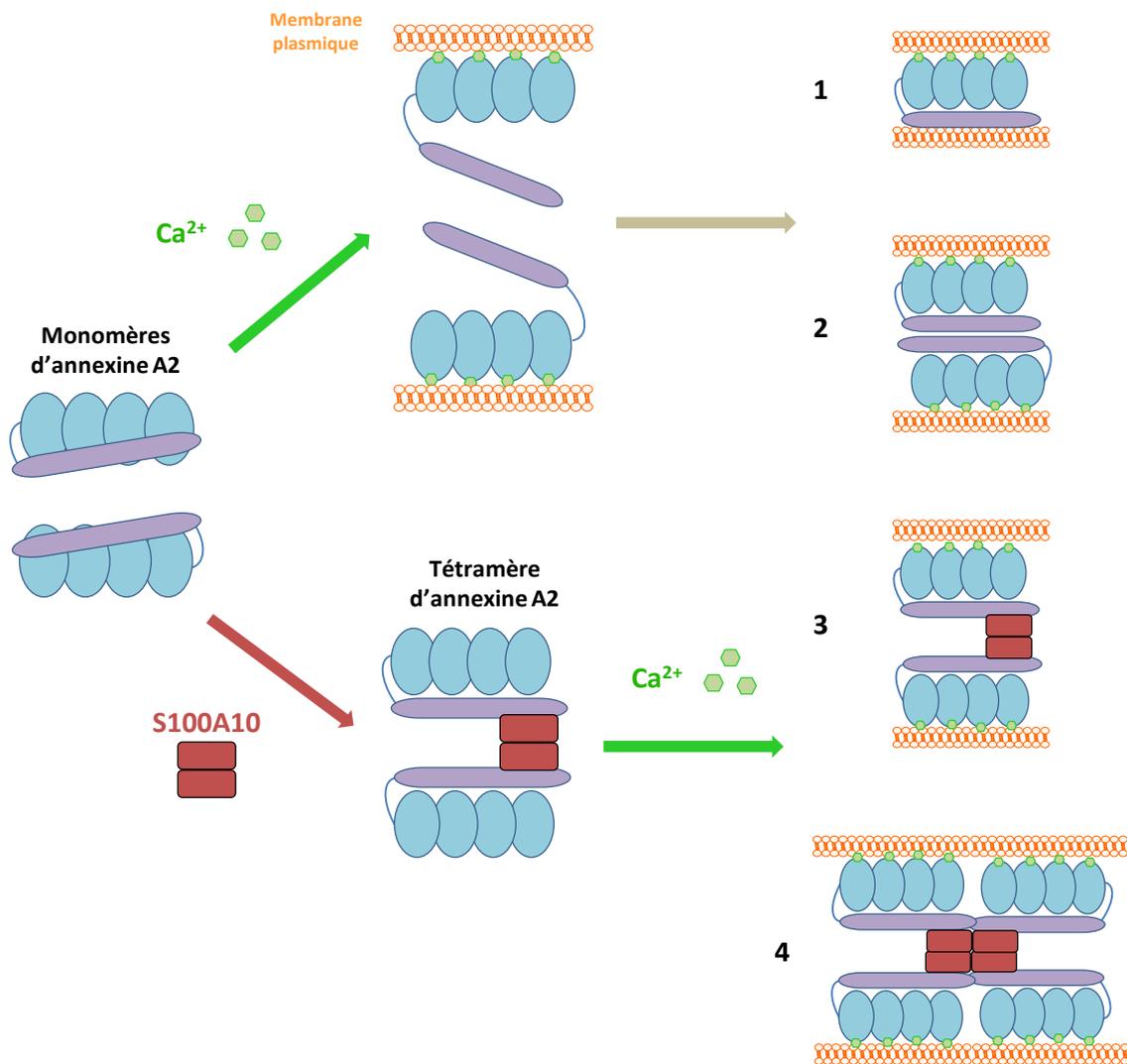
l'actine et aux phospholipides (**Figure 19**).

#### i. Interaction avec les protéines S100

Les 13 premiers acides aminés du domaine N-terminal de l'annexine A2 constituent le site de liaison pour la protéine S100A10, également appelée p11 (Rety et al., 1999). Cette petite protéine de 11 kilodaltons fait partie d'une famille de protéines dimériques acides, les S100, capables de lier le calcium grâce à des domaines de type "EF-hand" (Gerke et Weber, 1985). Cependant, la protéine S100A10 est une exception car elle possède des mutations dans ses domaines "EF-hand" qui la rendent insensible au calcium et qui de ce fait, lui confère un état constitutivement actif (Donato, 1999). La protéine S100A10 existe sous forme d'un homodimère, chaque face du dimère pouvant interagir avec une molécule d'annexine A2 pour former un hétérotétramère. Ce complexe est donc composé de 2 molécules d'annexine A2 et de 2 molécules de S100A10 (Thiel et al., 1992, Sopkova-de Oliveira Santos et al., 2000). La possibilité d'une association octamérique a également été suggérée (Sopkova-de Oliveira Santos et al., 2000, Menke et al., 2004).

L'association de l'annexine A2 sous forme tétramérique provoque des changements fonctionnels. Le tétramère possède plus d'affinité pour les lipides et pour le calcium que le monomère d'annexine A2 (Powell et Glenney, 1987, Evans et Nelsestuen, 1994). De plus, le tétramère a dix fois plus d'affinités que la forme monomérique pour des vésicules enrichies en PIP<sub>2</sub> et la différence devient d'autant plus grande en présence de calcium (Gokhale et al., 2005). Le tétramère peut également lier simultanément deux membranes (Lewit-Bentley et al., 2000, Lambert et al., 2004), ce qui lui permet d'agréger et de fusionner des granules chromaffines à une concentration calcique de l'ordre du micromolaire (**Figure 20**) (Drust et Creutz, 1988, Lizarbe et al., 2013).

Le tétramère annexine A2-S100A10 a été de loin le plus étudié dans la littérature depuis sa découverte, il y a maintenant plus de 30 ans (Erikson et al., 1984). Néanmoins, des études récentes montrent que l'annexine A2 est aussi capable d'interagir avec d'autres protéines de la famille S100, comme la S100A4, la S100A6 et la S100A11 (Liu et al., 2015). La S100A4 en particulier, est capable d'interagir avec l'annexine A2 pour former une structure tétramérique dont l'association est plus forte en absence de calcium (Semov et al., 2005). Le site de liaison de la S100A4 chevauche partiellement celui de la S100A10 dans la séquence



**Figure 20 : Les différents arrangements moléculaires de l'annexine A2.**

En présence de calcium, le monomère d'annexine A2 est capable de lier une bicouche lipidique. Cette interaction pourrait provoquer l'apparition d'un second site de liaison aux lipides dans le domaine N-terminal de l'annexine A2, qui pourrait alors lier deux membranes (1). Deux molécules d'annexine A2 peuvent s'assembler *via* leur domaine N-terminal et les deux faces concaves de leur domaine « cœur » peuvent alors assembler les membranes (2). En présence d'un dimère de S100A10, l'annexine A2 adopte une conformation tétramérique. Ce complexe peut lier deux membranes en présence de calcium (3) et s'associer avec un autre tétramère pour former un complexe octamérique (4).

(D'après Lizarbe et al., 2013)

de l'annexine A2. La liaison de la S100A4 est légèrement plus distale que la S100A10 et inclut des sites de phosphorylation. De fait, la liaison de la S100A4 pourrait réguler l'état de phosphorylation de l'annexine A2 (Semov et al., 2005).

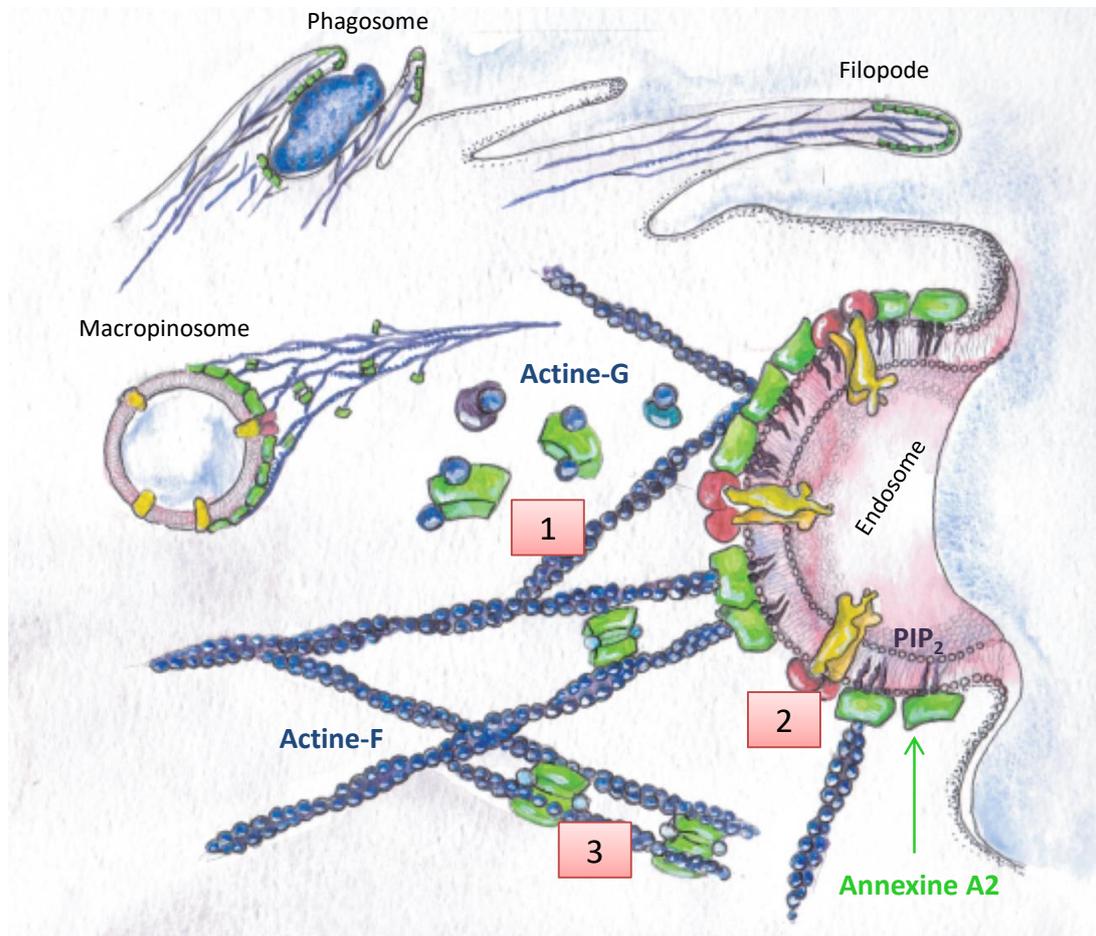
## **ii. Liaison aux phospholipides**

En présence de calcium, l'annexine A2 est capable de lier les phospholipides chargés négativement comme le PA et le PS (Gerke et al., 2005). En absence de calcium, le cholestérol peut réguler la liaison de l'annexine A2 au PS (Ayala-Sanmartin et al., 2001). La particularité de l'annexine A2 est qu'elle possède une très forte affinité pour un phosphoinositide, le PIP<sub>2</sub> (Rescher et al., 2004). Son site de liaison pour ce lipide est situé du côté convexe du domaine "cœur", au niveau des lysines 279 et 281 (Gokhale et al., 2005). Dans certaines conditions, comme à pH acide, l'annexine A2 peut également lier la membrane plasmique indépendamment du calcium (Lambert et al., 2004, Monastyrskaya et al., 2008). Cette interaction pourrait avoir comme intérêt physiologique de promouvoir l'extrusion de l'annexine A2 hors de la cellule (Gerke et Moss, 2002).

En présence de calcium, l'annexine A2 est capable de s'oligomériser et de former des domaines en liant plusieurs molécules de PIP<sub>2</sub>, de cholestérol et de PS, pour permettre une organisation particulière au sein de la membrane plasmique (Oliferenko et al., 1999, Babiychuk et Draeger, 2000, Gerke et al., 2005, Gokhale et al., 2005). Cette propriété fait de l'annexine A2 un candidat idéal pour intervenir au cours de l'exocytose qui requiert la présence de domaines riches en cholestérol et en PIP<sub>2</sub> (Chasserot-Golaz et al., 2005).

## **iii. Liaison à l'actine**

Une autre particularité de l'annexine A2 est qu'elle est capable de lier l'actine sous sa forme monomérique et filamenteuse. Le site de liaison à l'actine est formé des 9 derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale (Filipenko et Waisman, 2001). L'annexine A2 est également dotée d'une activité de fasciculation des filaments d'actine en présence de calcium, c'est-à-dire qu'elle rassemble plusieurs filaments afin de former des faisceaux (Gerke et Weber, 1984). Les deux formes d'annexine A2, monomérique et tétramérique, sont dotées d'une activité de fasciculation mais, la forme tétramérique est beaucoup plus efficace (Ikebuchi et Waisman, 1990). De plus, l'annexine A2 est sensible à la withaférine A, une drogue aux propriétés anticancéreuses, qui stimule spécifiquement son activité de



**Figure 21 : Interaction de l'annexine A2 avec le cytosquelette d'actine.**

L'annexine A2 est capable d'interagir avec des monomères d'actine (1), de faire le lien entre des filaments d'actine et une membrane (2) et peut assembler plusieurs filaments d'actine entre eux (3).

(D'après Hayes et al, 2004)

fasciculation (Falsey et al., 2006, Bargagna-Mohan et al., 2007). Le site responsable de cette activité correspondant aux acides aminés 286 à 294 et est situé dans la 4ème répétition au sein du domaine "cœur" (Jones et al., 1992).

L'annexine A2, *via* son association à des structures dynamiques d'actine, est impliquée dans de nombreux processus comme la phagocytose, la pinocytose ou encore la migration cellulaire (Hayes et al., 2004). De part ses propriétés, elle permet de faire la jonction entre le cytosquelette d'actine et les lipides en assemblant des structures d'actine aux membranes cellulaires, créant ainsi de véritables plateformes dynamiques (**Figure 21**).

## **b) Régulation de l'annexine A2**

La partie N-terminale de l'annexine A2 contient de nombreux sites de modifications post-traductionnelles, qui permettent de réguler sa capacité de liaison avec ses différents partenaires (Bharadwaj et al., 2013). L'acétylation de la première sérine est nécessaire pour la formation du tétramère (Nazmi et al., 2012) mais l'annexine A2 peut également être régulée par glutathionylation sur sa cystéine 8 (Sullivan et al., 2000), par sumoylation sur la lysine 10 (Caron et al., 2015) ou encore par polyubiquitination (Lauvrak et al., 2005). Cependant, l'annexine A2 est principalement régulée par phosphorylation sur ses différentes sérines (11, 17, 21 et 25) et tyrosines (23, 29) (**Figure 19**).

### **i. Phosphorylations des sérines par la PKC**

L'annexine A2 est un des substrats des protéines kinase A et C (Gould et al., 1986, Borthwick et al., 2007). *In vitro*, la phosphorylation de l'annexine A2 par la PKC inhibe son activité d'agrégation des granules chromaffines mais est nécessaire pour induire la fusion des granules au cours du processus d'exocytose (Johnstone et al., 1992, Regnouf et al., 1995). Cette phosphorylation, indispensable au bon déroulement du processus d'exocytose, doit probablement avoir lieu après la translocation de l'annexine A2 à la périphérie cellulaire (Sarafian et al., 1991, Chasserot-Golaz et al., 1996, Delouche et al., 1997).

La dissociation du tétramère annexine A2-S100A10 est également régulée par phosphorylations des sérines 11 et 25. Ces sites de phosphorylations, situés à proximité du

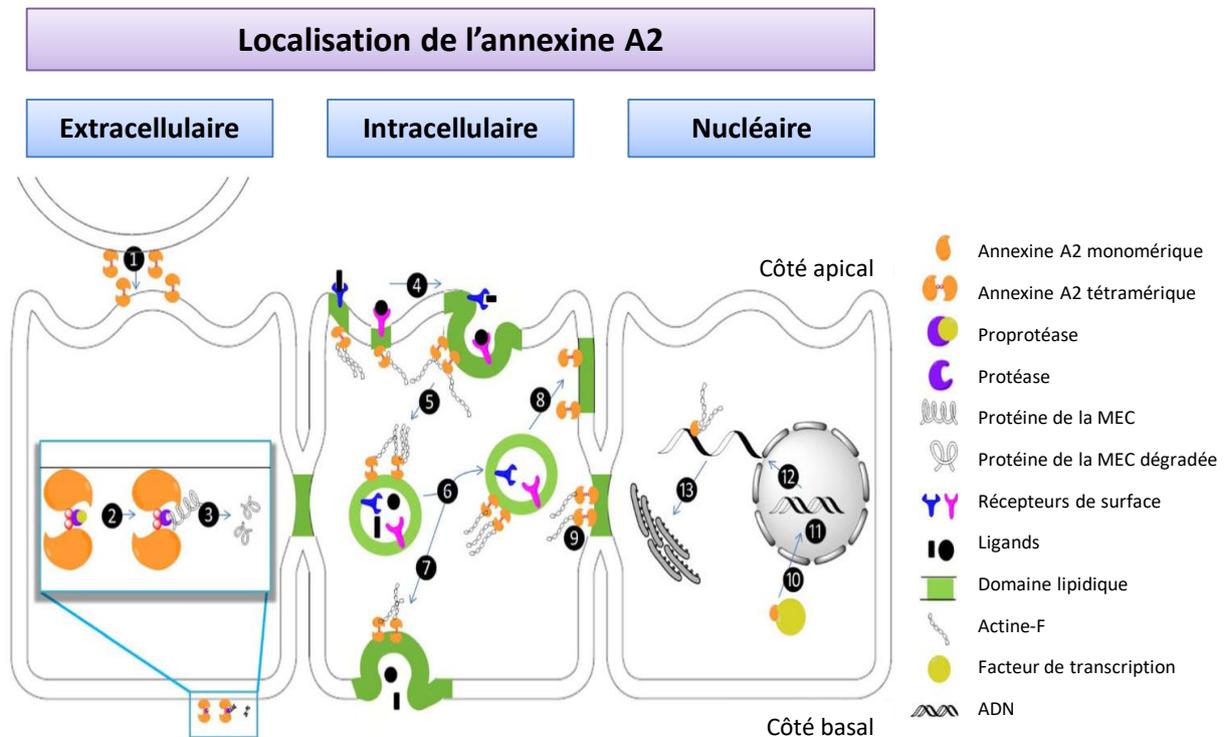
site de liaison à la protéine S100A10, sont moins accessibles lorsque l'annexine A2 est sous forme tétramérique et diminue la capacité de l'annexine à être régulée par des protéines kinases (Johnsson et al., 1986). Il faut donc que les sérines 11 et 25 soient déphosphorylées pour permettre l'assemblage du tétramère (Jost et Gerke, 1996, He et al., 2011). De plus, dans les cellules endothéliales humaines (HUVEC), la sérine 11 doit être déphosphorylée pour permettre la stabilisation du tétramère d'annexine A2, nécessaire à la sécrétion du facteur de von Willebrand (Brandherm et al., 2013).

## ii. Phosphorylation de la tyrosine 23

L'annexine A2 a été identifiée comme le substrat majoritaire de la tyrosine kinase de la famille Src, pp60<sup>src</sup> (Erikson et Erikson, 1980). Cette kinase est capable de phosphoryler un résidu critique de l'annexine A2, la tyrosine en position 23, qui module ses propriétés de liaison à l'actine et aux membranes (Glenney et Tack, 1985). La phosphorylation de la tyrosine 23 (Tyr<sup>23</sup>) induit un changement de conformation qui stabilise l'annexine A2 à la membrane (Morel et Gruenberg, 2009). Il a également été montré que cette phosphorylation favorise la liaison de l'annexine A2 avec le PA (Morel et Gruenberg, 2009). De plus, alors que les tétramères phosphorylés ou non sont capables de lier les granules chromaffines avec la même affinité, seule la forme non phosphorylée du complexe est capable de les agréger et de former des complexes membrane/granule (Hubaishy et al., 1995).

D'autres résultats montrent que cette phosphorylation régule la liaison de l'annexine A2 à l'actine. Par exemple, un mutant phosphomimétique pour la Tyr<sup>23</sup> de l'annexine A2 interagit plus efficacement avec l'actine (Rescher et al., 2008, Morel et Gruenberg, 2009) alors que la forme tétramérique d'annexine A2 phosphorylée sur la Tyr<sup>23</sup> n'est plus capable de lier l'actine, inhibant par conséquent son activité de fasciculation (Hubaishy et al., 1995). La phosphorylation de la Tyr<sup>23</sup> de l'annexine A2 n'affecte pas sa liaison avec S100A10, ni la formation du tétramère (Glenney et al., 1987, Morel et Gruenberg, 2009).

La phosphorylation de la Tyr<sup>23</sup> a également des effets sur la localisation cellulaire de l'annexine A2. Elle engendre l'entrée de l'annexine A2 dans le noyau (Eberhard et al., 2001) ou sa sortie hors des cellules (Deora et al., 2004, Zheng et al., 2011, Valapala et al., 2014, Grindheim et al., 2016). Cette phosphorylation est aussi impliquée dans le processus



**Figure 22 : Les principaux rôles de l'annexine A2.**

L'annexine A2 extracellulaire joue un rôle dans l'adhésion cellulaire (1) et dans la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) (2) en augmentant l'activité catalytique de protéases (3). A l'intérieur des cellules, le tétramère d'annexine A2 forme des domaines lipidiques capables d'induire une déformation membranaire (4). Le tétramère participe également au mouvement des vésicules d'endocytose (5) le long des filaments d'actine et des endosomes (6) ainsi qu'au processus de sécrétion de molécules solubles (7) ou de récepteurs recyclés (8). Le tétramère d'annexine A2 est aussi impliqué dans la formation des jonctions serrées (9). Lorsqu'elle est présente dans le noyau, l'annexine A2 y facilite l'importation de facteurs de transcription (10) et pendant la transcription, elle peut s'associer avec le complexe de liaison à l'ADN (11). L'annexine A2 est également capable de faciliter l'exportation des ARN messagers (12) et grâce à son interaction avec le cytosquelette d'actine, les transporte vers le RE où ils seront traduits (13).

(D'après Hitchcock et al., 2014).

d'endocytose, notamment dans l'endocytose du récepteur à l'insuline (Biener et al., 1996), et est nécessaire à l'association stable de l'annexine A2 avec les endosomes, ainsi qu'à leur transport du stade précoce à tardif (Morel et Gruenberg, 2009).

La phosphorylation sur la Tyr<sup>23</sup> affecte donc la liaison de l'annexine A2 aux phospholipides et à l'actine et peut conduire à des changements de localisation de la protéine (à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules). Cependant, l'importance fonctionnelle de cette phosphorylation dans le processus de sécrétion régulée n'a pas encore été étudiée et a fait l'objet d'une partie de mes recherches de thèse (**Résultats – Chapitre B**).

### 3) Rôles intracellulaires de l'annexine A2

L'annexine A2 joue de multiples rôles dans les cellules (**Figure 22**). Lorsqu'elle est localisée au niveau nucléaire, elle est impliquée dans la protection de l'ADN (Yano et al., 2013). De plus, elle intervient dans le processus de réplication en s'associant avec un complexe protéique de reconnaissance des amorces, qui stimule l'activité de l'ADN polymérase  $\alpha$  (Jindal et al., 1991, Vishwanatha et al., 1992). Elle participe également à de nombreux processus nécessitant la réorganisation du cytosquelette d'actine et le remodelage de la membrane plasmique comme la phagocytose ou la migration cellulaire. Capable de recruter et activer différentes Rho GTPases, l'annexine A2 engendre la réorganisation du cytosquelette d'actine, nécessaire à l'établissement de la polarité épithéliale (Grieve et al., 2012). Elle intervient également au cours de la sécrétion du surfactant par les cellules alvéolaires de type II ou des corps de Weibel Palade par les cellules endothéliales (Knop et al., 2004, Chintagari et al., 2006) mais son rôle dans le processus d'exocytose a principalement été étudié dans les cellules chromaffines (Ali et al., 1989, Sarafian et al., 1991, Chasserot-Golaz et al., 1996, Sagot et al., 1997). Dans la partie suivante, je me concentrerai sur les rôles de l'annexine A2 dans le trafic membranaire, notamment au cours des processus d'exocytose et d'endocytose.

#### a) L'annexine A2 au cours du processus de sécrétion

L'annexine A2 est une protéine qui possède des propriétés très attractives pour intervenir dans le processus d'exocytose puisqu'elle est capable de lier les principaux acteurs

de ce processus, c'est-à-dire, les membranes, l'actine et le calcium. De plus, elle est également capable d'induire *in vitro* l'agrégation et la fusion des granules de sécrétion (Drust et Creutz, 1988). Dans les cellules neuroendocrines, l'annexine A2 est la première protéine à avoir été identifiée à la jonction entre les granules et la membrane plasmique (Nakata et al., 1990). Son rôle dans l'exocytose régulée a été mis en évidence pour la première fois dans des cellules chromaffines bovines perméabilisées, ayant une activité de sécrétion réduite à cause de la perte de leurs protéines cytosoliques. En effet, l'ajout d'annexine A2 exogène est capable de restaurer le processus de sécrétion dans ces cellules (Sarafian et al., 1991).

#### **i. L'annexine A2 est recrutée à la membrane plasmique des cellules stimulées**

Dans les cellules non stimulées, l'annexine A2 monomérique est localisée dans le cytoplasme des cellules chromaffines alors que son partenaire, la protéine S100A10, se trouve dans la région subplasmalemmale. Lors d'une stimulation nicotinique, l'entrée de calcium provoque le recrutement de l'annexine A2 à la membrane plasmique. La translocation de l'annexine A2 vers la périphérie cellulaire est une étape essentielle au bon déroulement du processus d'exocytose car si celle-ci est bloquée, le processus de sécrétion est alors inhibé (Chasserot-Golaz et al., 1996).

L'annexine A2 est recrutée à la membrane plasmique à proximité des complexes SNARE par la protéine S100A10 (Umbrecht-Jenck et al., 2010). Cette protéine est capable d'interagir avec une protéine du complexe SNARE, la VAMP2, qui est elle-même associée à la membrane plasmique (Umbrecht-Jenck et al., 2010). Lorsque la protéine VAMP2 est clivée par la toxine tétanique, la protéine S100A10 devient cytosolique et la translocation de l'annexine A2 est inhibée. De plus, au sein de la membrane plasmique, les protéines S100A10, VAMP2 et syntaxine sont regroupées en domaines. Ces zones de membrane plasmique pourraient correspondre à des pré-sites d'exocytose et le recrutement de l'annexine A2 par la protéine S100A10 au niveau des protéines SNARE permet de mettre en évidence un lien fonctionnel entre l'annexine A2 et le processus de sécrétion des catécholamines (Umbrecht-Jenck et al., 2010).

S100A10 est exprimée uniquement dans les cellules adrénergiques, ce qui suggère que dans les cellules noradrénergiques, le recrutement ne nécessite pas la formation du

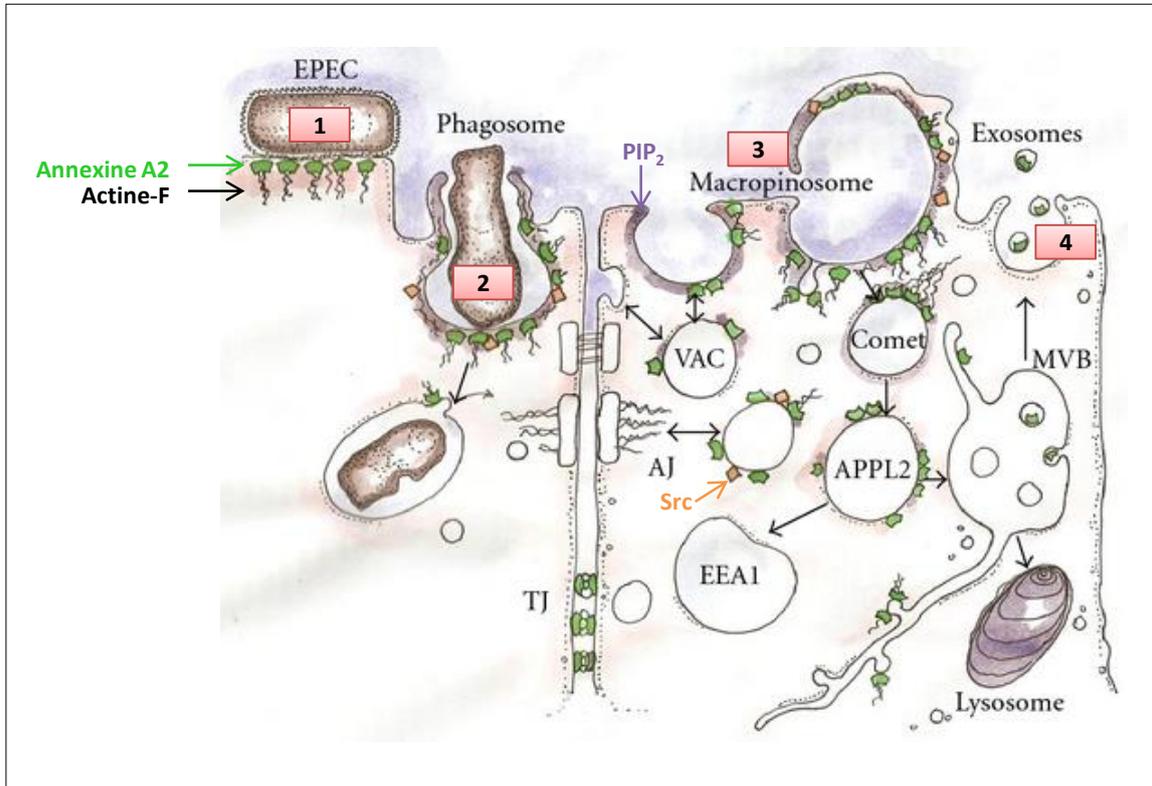
tétramère. L'annexine A2 pourrait alors se lier directement à la membrane plasmique, puisqu'elle interagit de façon calcium-dépendante avec les phospholipides, ou elle pourrait également être recrutée par l'intermédiaire d'un autre partenaire comme par exemple une protéine de la famille S100, la S100A4 (Liu et al., 2015). Cette différence pourrait expliquer pourquoi, dans les cellules adrénérgiques, la translocation de l'annexine A2 et l'exocytose nécessitent une concentration calcique moins importante (Chasserot-Golaz et al., 1996).

## ii. **L'annexine A2 participe à l'organisation spatiotemporelle des sites d'exocytose**

Dans les cellules chromaffines stimulées, des domaines lipidiques enrichis en GM1, PIP<sub>2</sub> et en cholestérol ont été mis en évidence (Chasserot-Golaz et al., 2005, Umbrecht-Jenck et al., 2010). L'implication de l'annexine A2 dans la formation de ces domaines a donc été activement étudiée puisqu'elle possède des caractéristiques structurales qui lui permettent d'influencer l'organisation des membranes. En effet, l'annexine A2 se lie préférentiellement à des membranes enrichies en cholestérol et en sphingolipides, et est capable d'induire la formation de domaines lipidiques *in vitro* et *in vivo* (Rescher et al., 2004, Gerke et al., 2005, Drucker et al., 2013). De plus, dans les cellules chromaffines, des expériences de fractionnement subcellulaire ont mis en évidence que l'annexine A2 est présente dans la fraction "insoluble au Triton-X100" des cellules stimulées, fraction contenant les protéines liées au cytosquelette et aux radeaux lipidiques (Chasserot-Golaz et al., 1996).

Dans les cellules chromaffines, lorsque la translocation de l'annexine A2 est bloquée, la sécrétion des catécholamines est inhibée, tout comme la formation des domaines lipidiques (Chasserot-Golaz et al., 1996). De plus, le recrutement de l'annexine A2 vers la membrane plasmique précède la formation des domaines lipidiques (Chasserot-Golaz et al., 2005). L'annexine A2 participe donc à la formation des plateformes lipidiques nécessaires au bon déroulement du processus d'exocytose. Le mécanisme par lequel l'annexine A2 forme ces plateformes n'est actuellement pas connu. Cette question a constitué une partie de mon projet de thèse (**Résultats – Chapitre A**).

Durant mon doctorat, j'ai également écrit une revue qui rassemble les données connues sur l'importance fonctionnelle de l'annexine A2 au cours de la sécrétion des cellules chromaffines (Gabel et Chasserot-Golaz, 2016), consultable en **Annexe 1**.



**Figure 23 : Implication de l'annexine A2 dans les voies d'endocytose.**

Les interactions entre l'annexine A2 et l'actine sont impliquées dans le mécanisme d'entrée non invasif de l'entéropathogène *Escherichia coli* (EPEC) (1). L'annexine A2 est recrutée au niveau des structures d'actine associées aux phagosomes pendant la phagocytose des segments externes des cellules épithéliales pigmentaires de la rétine (2). L'annexine A2 est associée aux domaines enrichis en PIP<sub>2</sub> des macropinosomes et participe à la formation de leur comète d'actine (Comet). La maturation des macropinosomes en endosomes précoce (APPL2) est dépendante de l'annexine A2. Ils deviennent ensuite des endosomes matures (EEA1). L'annexine A2 et les endosomes jouent un rôle dans la formation des jonctions adhérentes (AJ) et l'annexine A2 pourrait également participer à la formation des vacuoles (VAC) qui fusionnent avec la membrane apicale (3). Lors de la fusion des corps multivésiculaires (MVB) avec la membrane plasmique, l'annexine A2 peut être libérée *via* les exosomes et joue un rôle dans la stabilisation des jonctions serrées (TJ) (4).

(D'après Grieve et al, 2012)

## **b) Implication de l'annexine A2 dans le processus d'endocytose**

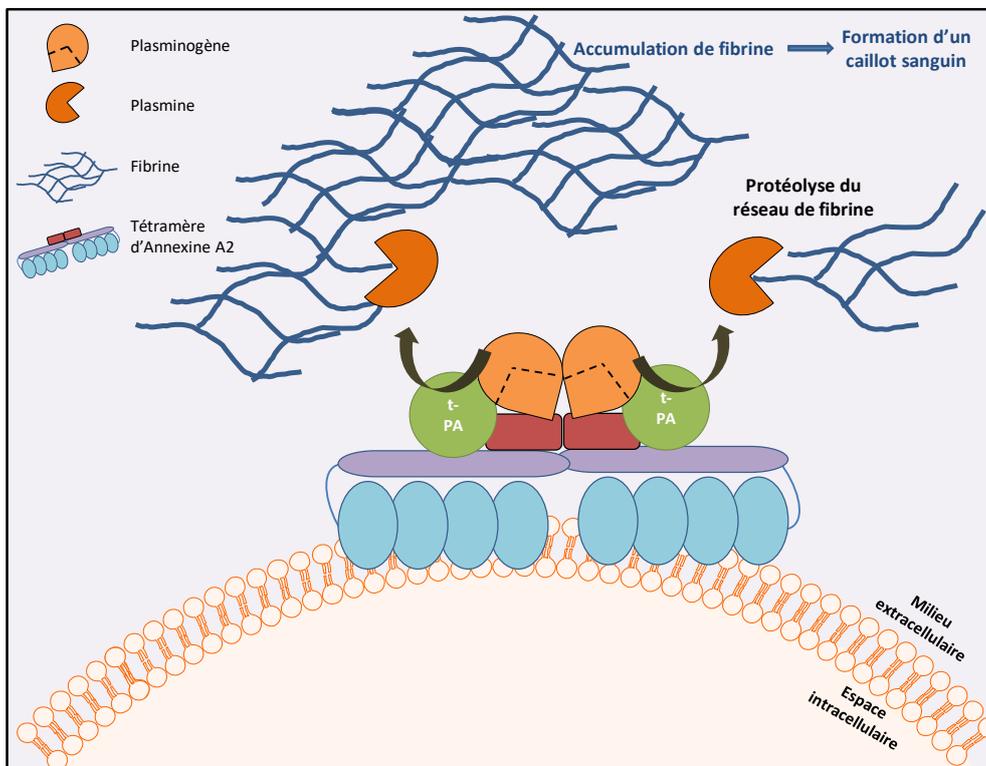
L'annexine A2 participe également à différentes étapes du trafic endosomal (**Figure 23**) (Grieve et al., 2012). Impliquée dans l'endocytose de différents récepteurs comme celui de l'insuline, de l'acide hyaluronique (CD44) ou de l'EGF (Epidermal Growth Factor), l'annexine A2 pourrait induire leur accumulation dans les radeaux lipidiques (Biener et al., 1996, Oliferenko et al., 1999, de Graauw et al., 2014). La formation de ces domaines pourrait être responsable de la déformation membranaire nécessaire à l'initiation de l'endocytose (Drucker et al., 2013). L'annexine A2 a aussi été mise en évidence sur la membrane des endosomes précoces (Jost et al., 1997, Zeuschner et al., 2001) où elle facilite le transport des endosomes, *via* son interaction avec le cytosquelette d'actine (Morel et Gruenberg, 2009, Morel et al., 2009, Hitchcock et al., 2014). L'annexine A2 intervient également dans le recyclage et la dégradation des endosomes (Mayran et al., 2003, Zobiack et al., 2003).

## **4) Rôles extracellulaires de l'annexine A2**

L'annexine A2 possède également des fonctions à l'extérieur des cellules, liées à sa présence sur la face externe de celles-ci. Son rôle le plus connu et le plus étudié est celui dans l'homéostasie du système vasculaire en tant que co-récepteur du t-PA (Hajjar et al., 1994).

### **a) L'annexine A2 dans le système fibrinolytique**

L'activation de la plasmine est impliquée dans différents processus physiologiques et pathologiques, comme la fibrinolyse ou l'invasion tumorale. Lors du processus fibrinolytique, la génération de plasmine permet de cliver les caillots de fibrine et participe à la dégradation des matrices extracellulaires. L'activation de ce système nécessite la coopération de plusieurs acteurs : une pro-enzyme, le plasminogène, converti par le t-PA en une serine protéase, la plasmine. La génération de plasmine est accélérée par la liaison du plasminogène à ses récepteurs, situés à la surface des cellules, qui captent le plasminogène et le rapprochent de son activateur, le t-PA (Bharadwaj et al., 2013). Le tétramère d'annexine A2 a été identifié comme un de ces récepteurs à la surface des cellules endothéliales, mais les sites de liaison des deux protagonistes sur ce tétramère ne sont pas



**Figure 24 : Le tétramère d'annexine A2 dans le processus de fibrinolyse.**

À la surface des cellules, le tétramère d'annexine A2 joue le rôle de récepteur du plasminogène et de son activateur, le t-PA. Le tétramère est capable de capter ces deux acteurs, ce qui permet d'accélérer la transformation du plasminogène en plasmine. La plasmine pourra alors dégrader la matrice extracellulaire, et notamment la fibrine, une protéine filamenteuse insoluble, qui si elle s'accumule, conduit à la formation d'un caillot sanguin.

connus avec précision (**Figure 24**) (Cesarman et al., 1994, Hajjar et al., 1994) .

Dans leur structure, le plasminogène et le t-PA possèdent respectivement 5 et 2 domaines "boucles" (kringle). Cette structure tertiaire en forme de boucle est due à la présence de ponts disulfures entre plusieurs cystéines. C'est un motif riche en lysines, situé à l'extrémité C-terminale des récepteurs, qui assure la reconnaissance des domaines boucles. La protéine S100A10 possédant un domaine enrichi en lysine en position C-terminale, elle pourrait être le site de liaison du plasminogène et du t-PA sur le tétramère d'annexine A2 (Felez et al., 1996). Cependant, l'annexine A2 possède également des résidus qui entrent en jeu lors de cette liaison, comme la lysine en position 307 qui, lorsqu'elle est mutée, empêche la liaison du plasminogène au tétramère d'annexine A2. De plus, un domaine de liaison au t-PA, correspondant aux acides aminés 7 à 12, a été identifié dans le domaine N-terminal de l'annexine A2 (Flood et Hajjar, 2011).

L'importance fonctionnelle de la liaison de l'annexine A2 au t-PA et au plasminogène n'est pas clairement établie. Soit elle permettrait de positionner le t-PA et le plasminogène de façon idéale pour permettre d'augmenter l'efficacité catalytique du t-PA, et par conséquent, la génération de plasmine (Dassah et al., 2009, Flood et Hajjar, 2011), soit l'annexine A2 jouerait uniquement un rôle de protéine de stabilisation pour la S100A10, qui serait le seul récepteur du plasminogène et du t-PA (Madureira et al., 2011, O'Connell et Waisman, 2012). Dans tous les cas, l'annexine A2 possède un rôle important dans le processus de fibrinolyse, car de façon directe ou indirecte, elle est capable de réguler la génération et l'activité de la plasmine (Choi et al., 1998, MacLeod et al., 2003).

## **b) Implication de l'annexine A2 dans les processus de communication cellulaire**

D'autres rôles ont également été proposés pour l'annexine A2 extracellulaire, notamment au cours des processus d'adhésion et de migration cellulaires.

### **i. Processus d'adhésion et interactions cellulaires**

L'annexine A2 est capable d'interagir avec des protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène (Wirl et Schwartz-Albiez, 1990) ou la ténascine-C (Chung et Erickson, 1994). Elle pourrait donc s'associer directement avec ces composés et activer leur récepteur de surface et/ou être impliquée dans la transduction de leur signal. L'annexine A2 pourrait,

comme l'annexine A5, former un canal perméable aux ions calciques lorsqu'elle est dans une membrane lipidique (Berendes et al., 1993, Chung et Erickson, 1994).

En plus d'un rôle dans l'adhésion cellule/matrice extracellulaire, l'annexine A2 est également impliquée dans les processus d'adhésion entre cellules et participe par exemple à l'établissement des jonctions serrées entre les cellules épithéliales (Lee et al., 2004). L'annexine A2 étant capable de lier simultanément deux membranes, elle interagit avec les membranes cellulaires de deux cellules voisines comme cela a déjà été montré dans les cellules souches hématopoïétiques et dans les cellules cancéreuses, où l'annexine A2 permet de faire la jonction avec les cellules endothéliales vasculaires (Jung et al., 2007, Myrvang et al., 2013).

## **ii. Migration cellulaire**

L'annexine A2 extracellulaire est également impliquée dans plusieurs processus migratoires, comme par exemple dans le processus de chimiotaxie médié par le ceramide-1-phosphate. Ce sphingolipide permet de faciliter l'invasion cellulaire des macrophages et des cellules hématopoïétiques à travers la matrice extracellulaire grâce à sa liaison au tétramère d'annexine A2 (Hankins et al., 2013). À la surface des lymphocytes apoptotiques, les tétramères d'annexine A2 se concentrent au niveau des domaines riches en PS. Ces domaines constituent un signal qui permet aux cellules apoptotiques d'être reconnues par les macrophages exprimant également le tétramère d'annexine A2 à leur surface. Les interactions entre les tétramères des deux cellules pourraient faciliter l'adhésion entre les deux partenaires et initier le processus de phagocytose (Fan et al., 2004, Hitchcock et al., 2014).

Ces dernières années, l'annexine A2 extracellulaire a particulièrement été étudiée dans les cellules cancéreuses (Zhang et al., 2012, Xu et al., 2015). En effet, elle joue un rôle dans différentes étapes de la progression tumorale : l'adhésion, la prolifération et l'invasion cellulaires (Diaz et al., 2004, Sharma et al., 2006, Xu et al., 2015). Si l'annexine A2 est inhibée par un ARN interférent ou par la présence d'anticorps anti-annexine A2 dans le milieu extracellulaire, la capacité d'invasion des cellules est réduite et la formation des métastases est inhibée (Sharma et al., 2006, Zheng et al., 2011). De plus, l'annexine A2 étant capable d'interagir avec la ténascine-C et la procathepsine B, une enzyme impliquée dans la

progression tumorale, l'annexine A2 pourrait être le lien structural entre les cellules tumorales et la matrice extracellulaire (Chung et al., 1996, Mai et al., 2000a, Mai et al., 2000b).

### c) L'annexine A2, voie d'entrée et de sortie de plusieurs pathogènes

L'annexine A2, sous forme monomérique ou tétramérique, est impliquée dans les processus d'entrée, de sortie et de multiplication de différents virus, comme le cytomegalovirus (Raynor et al., 1999, Derry et al., 2007), l'entérovirus 71 (Yang et al., 2011), le papillomavirus de type 16 (Dziduszko et Ozburn, 2013), le vésivirus de lapin (Gonzalez-Reyes et al., 2009), le virus respiratoire syncytial (Malhotra et al., 2003) ou encore le virus du sida VIH-1 (Rai et al., 2010). Les rôles connus de l'annexine A2 au cours de l'infection virale sont exposés dans le tableau suivant :

<b>Le cytomegalovirus</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Liaison à l'enveloppe du virus</li><li>• Capacité de ponter la membrane du virus à une membrane de phospholipides</li><li>• Augmentation de la fusion virus-membrane</li></ul>
<b>L'entérovirus 71</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Entrée du virus</li><li>• Régulation de son infectiosité</li></ul>
<b>Le papillomavirus de type 16</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Liaison et entrée du virus</li><li>• Trafic intracellulaire des particules virales</li></ul>
<b>Le vésivirus de lapin</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Attachement du virus et/ou pénétration dans les cellules</li></ul>
<b>Le virus respiratoire syncytial</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Récepteur à la surface des cellules</li></ul>
<b>Virus du sida VIH-1</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Infectiosité du virus</li></ul>

Cette partie illustre la diversité des localisations et des rôles que peut avoir l'annexine A2 au sein des cellules. Ses mécanismes d'action au cours de ces différents processus ne sont pas connus précisément. À l'interface entre les membranes et le cytosquelette, elle est un candidat très attractif et très prometteur pour l'établissement de

nouvelles stratégies thérapeutiques, notamment en cancérologie (Dong et al., 2014, Woodham et al., 2015).

# **Partie II :**

# **Résultats**

# A. La fasciculation des filaments d'actine par l'annexine A2 participe à la formation des domaines lipidiques

## 1) Introduction

À mon arrivée au laboratoire, l'implication fonctionnelle de l'annexine A2 dans la formation des domaines lipidiques au cours du processus d'exocytose avait été mise en évidence (Chasserot-Golaz et al., 2005, Umbrecht-Jenck et al., 2010). Pour poursuivre ce travail, la question primordiale qu'il restait à élucider était de savoir comment, l'annexine A2 pouvait modifier la structure de la membrane plasmique, pour y former des microdomaines lipidiques.

Pour répondre à cette question, plusieurs hypothèses étaient envisageables. En effet, l'annexine A2 est capable d'interagir avec les lipides et de les rassembler en amas, elle pourrait donc les agréger directement pour former des domaines lipidiques (Ross et al., 2003, Menke et al., 2005). La deuxième hypothèse était l'intervention d'un partenaire intermédiaire, capable d'influencer la mobilité des lipides. Le cytosquelette d'actine était un bon candidat puisqu'il intervient tout au long du processus d'exocytose (Hayes et al., 2004) et interagit avec l'annexine A2 pour former des complexes membrane/cytosquelette (Merrifield et al., 2001, Zobiack et al., 2002).

Nous nous sommes donc intéressés au rôle de l'actine dans la formation des domaines lipidiques par l'annexine A2. Après avoir identifié des structures d'actine au niveau des domaines lipidiques, nous avons pu mettre en évidence par tomographie électronique l'organisation spatiale des filaments d'actine qui entourent le granule arrimé. Nous avons également démontré la présence d'annexine A2 à proximité de ces structures. L'annexine A2 ayant une activité de fasciculation de l'actine-F en présence de calcium, nous avons étudié si cette fonction était nécessaire à la formation des plateformes lipidiques et à la sécrétion. Pour cela, deux approches ont été utilisées : une approche pharmacologique, en étudiant

l'effet de la withaférine A, une toxine qui augmente l'activité de fasciculation de l'actine-F par l'annexine A2, et une approche moléculaire, en exprimant dans les cellules chromaffines, un mutant, annexine A2 K286A, ayant une mutation ponctuelle dans le site de fasciculation.

## 2) Publication 1

**Gabel M**, Delavoie F, Demais V, Royer C, Bailly Y, Vitale N, Bader MF, Chasserot-Golaz S (2015) Annexin A2-dependent actin bundling promotes secretory granule docking to the plasma membrane and exocytosis. *J Cell Biol* 210:785-800.

## 3) Publication 2

**Gabel M**, Delavoie F, Vitale N, Bader MF, Chasserot-Golaz S (2016) Actine et annexine A2 : Partenaires essentiels pour le contrôle de la sécrétion neuroendocrine. *Med Sci (Paris)*. 2016 6-7;32(6):553-555.

# **Publication 1**

# Annexin A2–dependent actin bundling promotes secretory granule docking to the plasma membrane and exocytosis

Marion Gabel,<sup>1</sup> Franck Delavoie,<sup>3</sup> Valérie Demais,<sup>2</sup> Cathy Royer,<sup>2</sup> Yannick Bailly,<sup>1</sup> Nicolas Vitale,<sup>1</sup> Marie-France Bader,<sup>1</sup> and Sylvette Chasserot-Golaz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, UPR3212 Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, F-67084 Strasbourg, France  
<sup>2</sup>Plateforme Imagerie In Vitro, Neuropôle de Strasbourg, F-67084 Strasbourg, France  
<sup>3</sup>Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote, UMR5099 Centre National de la Recherche Scientifique-Université de Toulouse III Paul Sabatier, F-31000 Toulouse, France

Annexin A2, a calcium-, actin-, and lipid-binding protein involved in exocytosis, mediates the formation of lipid microdomains required for the structural and spatial organization of fusion sites at the plasma membrane. To understand how annexin A2 promotes this membrane remodeling, the involvement of cortical actin filaments in lipid domain organization was investigated. 3D electron tomography showed that cortical actin bundled by annexin A2 connected docked secretory granules to the plasma membrane and contributed to the formation of GM1-enriched lipid microdomains at the exocytotic sites in chromaffin cells. When an annexin A2 mutant with impaired actin filament–bundling activity was expressed, the formation of plasma membrane lipid microdomains and the number of exocytotic events were decreased and the fusion kinetics were slower, whereas the pharmacological activation of the intrinsic actin-bundling activity of endogenous annexin A2 had the opposite effects. Thus, annexin A2–induced actin bundling is apparently essential for generating active exocytotic sites.

## Introduction

Exocytosis of vesicular contents through the fusion of secretory vesicles/granules with the plasma membrane is a fundamental cellular process involved in many cellular functions, including cell migration, wound repair, neurotransmission, and hormone secretion. In neurons and neuroendocrine cells, calcium-dependent exocytosis has been a topic of intense investigation for decades, and many molecular players that orchestrate secretory vesicle recruitment, docking, and fusion with the plasma membrane have been identified (Jahn and Fasshauer, 2012). However, the functional characteristics of the exocytotic sites that ensure vesicle tethering to appropriate active membrane areas and assembly of the exocytotic machinery (Ammar et al., 2013) remain poorly understood. Distinct lipid compositions within the plasma membrane have been proposed to provide spatial cues to recruit and assemble components of the exocytotic machinery. For instance, cholesterol-enriched lipid microdomains (rafts) formed at granule docking sites could play this role based on the finding that proteins required for exocytosis are associated with cholesterol-dependent regions in the plasma membrane (Chasserot-Golaz et al., 2010; Sebastião et al., 2013). In addition, phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) has been shown to form microdomains in the plasma membrane,

which seems to be required for efficient SNARE-mediated granule docking and fusion with the plasma membrane (Aoyagi et al., 2005; Lang, 2007). In chromaffin cells, we have previously found that secretagogue-evoked stimulation induces the de novo formation of ganglioside GM1/cholesterol/PI(4,5)P<sub>2</sub>-enriched lipid microdomains, which seem necessary for catecholamine secretion (Chasserot-Golaz et al., 2005; Umbrecht-Jenck et al., 2010). All together, these data suggest that the occurrence of an unknown regulated mechanism responsible for lipid segregation and clustering creates exocytotic sites.

Annexin A2 (AnxA2) belongs to a family of calcium-, actin- and phospholipid-binding proteins that are widely expressed in eukaryotic cells. Annexins have emerged as important links between intracellular Ca<sup>2+</sup> signals and the regulation of various membrane functions such as regulating the organization of membrane domains and/or linking the cytoskeleton to the plasma membrane (Gerke et al., 2005). AnxA2 can exist as a monomer or as part of a heterotetrameric complex with the protein S100A10, where the central S100A10 dimer binds two AnxA2 chains, forming a scaffold that can bridge opposing membrane surfaces and actin filaments (Lewit-Bentley et al., 2000). There is growing evidence that AnxA2 is involved in

Correspondence to Sylvette Chasserot-Golaz: chasserot@inci-cnrs.unistra.fr  
 Abbreviations used in this paper: AnxA2, Annexin A2; DBH, dopamine-β-hydroxylase; PI(4,5)P<sub>2</sub>, phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate; PSF, prespike foot; TEM, transmission electron microscopy; WA, withaferin A; WT, wild type.

© 2015 Gabel et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

Supplemental Material can be found at:  
<http://jcb.rupress.org/content/suppl/2015/08/27/jcb.201412030.DC1.html>

calcium-dependent exocytosis (Bharadwaj et al., 2013). Using a gene knockdown strategy in chromaffin cells, we have previously described a role for AnxA2 in the formation of the GM1/cholesterol/PI(4,5)P<sub>2</sub>-enriched lipid microdomains at granule docking sites after cell stimulation (Chasserot-Golaz et al., 2005; Umbrecht-Jenck et al., 2010). Hence, AnxA2 exhibits many attractive properties to ensure lipid domain coalescence. It binds lipids in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner (Gokhale et al., 2005) and displays an F-actin–bundling activity when interacting with S100A10 (Donato, 2001). As the actin cytoskeleton has also been proposed to act as a scaffold that forms organized lipid domains and recruits selected proteins (Sankaranarayanan et al., 2003; Dinic et al., 2013), we investigated whether AnxA2 could organize actin filaments to promote the formation of lipid microdomains in the plasma membrane. These results reveal that AnxA2 and the actin cytoskeleton are essential partners to provide lipid platforms for granule recruitment and fusion, and challenge the classical role depicted for the cortical actin cytoskeleton in calcium-dependent exocytosis.

## Results

### Actin filaments contribute to the formation of GM1-enriched granule docking sites in nicotine-stimulated chromaffin cells

We first investigated whether actin filaments were associated with the lipid domains formed at the exocytotic sites in nicotine-stimulated cells. A triple labeling experiment was performed using phalloidin to detect F-actin, anti-dopamine-β-hydroxylase (DBH) antibodies to visualize exocytotic sites (Chasserot-Golaz et al., 2005), and fluorescent cholera toxin to label GM1-enriched domains (Harder et al., 1998; Janes et al., 1999). In unstimulated chromaffin cells (Fig. 1 A), actin formed a cortical network, which is classically believed to prevent chromaffin granule docking at the plasma membrane (Sontag et al., 1988). No DBH patches were detected, confirming the low basal secretory activity in the absence of a secretagogue, and only a weak staining with cholera toxin was observed at the cell surface. In nicotine-stimulated cells, the actin barrier was partially removed, a patchy DBH staining pattern appeared at the cell surface, and the binding of fluorescent cholera toxin was concomitantly increased, revealing the formation of GM1-enriched microdomains. Residual F-actin colocalized with both GM1-enriched domains and DBH-positive exocytotic sites as shown in mask images (Fig. 1 A). Quantification of the relative proportion of F-actin associated with cholera toxin or DBH indicated that, in stimulated chromaffin cells, ~50% of the residual actin filaments were associated with GM1 domains and exocytotic sites (Fig. 1 B).

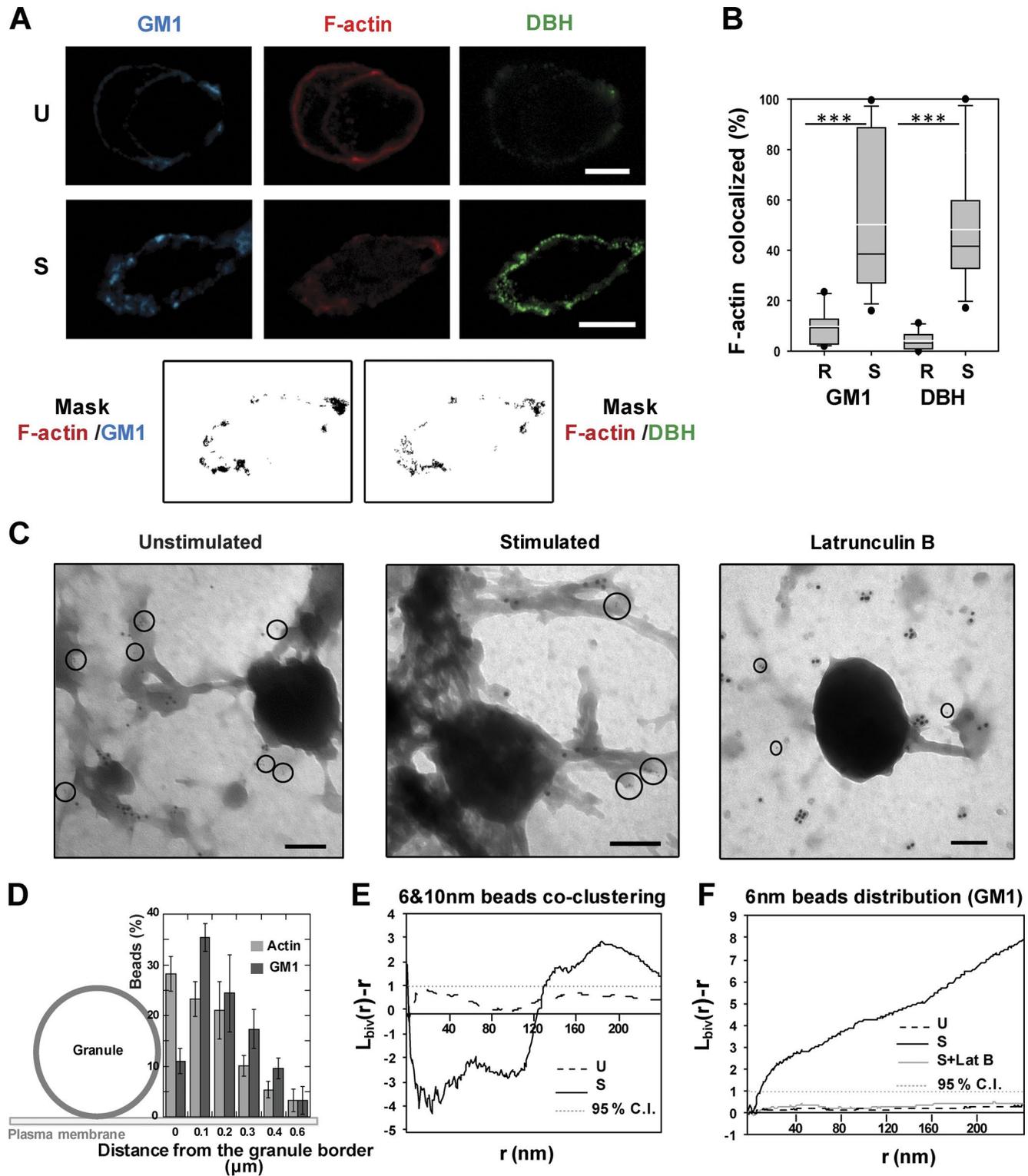
Using immunogold electron microscopy, the distribution of actin and GM1 was studied on native plasma membrane sheets prepared from unstimulated or nicotine-stimulated chromaffin cells (Wilson et al., 2004; Umbrecht-Jenck et al., 2010). In unstimulated cells, GM1 (6 nm gold particles) was uniformly dispersed in small clusters containing 2–3 particles (circles in Fig. 1 C and Fig. S1). Actin formed dark filamentous structures as revealed using anti-actin antibodies (10 nm gold particles), some of them connecting granules docked to the plasma membrane (Fig. 1 C). Conversely, in nicotine-stimulated cells, GM1 was found in larger clusters associated with actin filaments near docked granules (Fig. 1 C). An increase in the amount of actin

was also observed at the surface of docked granules, suggesting that secretory granules were coated with actin during exocytosis. Numerical analysis of the particle distribution relative to the granules showed that actin and GM1 were concentrated in a 0.1-μm zone from the edge of granules (Fig. 1 D). Analysis of the spatial distribution of GM1 and actin using Ripley's K function confirmed that GM1 was randomly distributed in unstimulated cells. However, in nicotine-stimulated cells (Fig. 1 F), GM1 significantly clustered with actin in domains with a radius of 180–200 nm (Fig. 1 E). Thus, the increase of cholera toxin binding observed at the surface of stimulated cells by light microscopy (Fig. 1 A) is likely to be the result of the coalescence of GM1 nanodomains triggered by cell stimulation (Chasserot-Golaz et al., 2005). Collectively, these results suggest that in chromaffin cells, secretagogues induce the formation of GM1-enriched microdomains associated with actin filaments and docked secretory granules at the plasma membrane.

To assess the role of these actin filaments in the formation of GM1-enriched domains, chromaffin cells were treated with 50 μM latrunculin B to depolymerize F-actin (Gasman et al., 2004). Latrunculin B caused the disappearance of the actin filaments associated with docked granules on plasma membrane sheets from nicotine-stimulated cells (Fig. 1 C, Latrunculin B). Secretory granules also appeared smoother, possibly because of the absence of their actin coating. In parallel, latrunculin B impaired GM1 labeling, which was randomly distributed as in unstimulated membranes (Fig. 1 F). Thus, latrunculin B inhibited the formation of GM1 clusters in nicotine-stimulated chromaffin cells, suggesting that F-actin is involved in the formation of GM1-enriched domains during exocytosis.

Electron tomography was then used to determine architectural details of the spatial organization of the actin filaments present at the inner face of the plasma membrane in nicotine-stimulated cells (Fig. 2 and Video 1). As seen on a 3D representation of docked granules obtained from tomographic slices (Fig. 2, C–H), actin filaments labeled with anti-actin antibodies formed a meshwork running parallel to the plasma membrane (Fig. 2 B, in blue) and connected secretory granules to the plasma membrane (Fig. 2 B, in green). Equatorial sections of docked granules (Fig. 2 I) revealed anchoring points for actin filaments on the granule surface. Moreover, the granule surface was covered with actin filaments (Fig. 2 J), confirming the presence of an actin coating on granules docked at exocytotic sites.

The side-view of tilt transmission electron microscopy (TEM) series reconstructions of docked granules at different stages of fusion clearly showed that actin bundles linked secretory granules to the plasma membrane (PM) through specific membrane-associated structures (Fig. 3 A, V). These structures could correspond to the fine strands cross-linking granules to the plasma membrane previously revealed by quick-freeze, deep-etch electron microscopy (Nakata et al., 1990). These actin filaments were also observed when granules collapsed gradually to fuse with the plasma membrane. As recently described by Chiang et al. (2014), the size of the granules undergoing exocytosis seemed to decrease. It is interesting to note the positive curvature of the plasma membrane under docked granules that could be caused by forces exerted by the formation of actin bundles. Fig. 3 B shows that actin filaments connected secretory granules to the plasma membrane at anchor points localized in an area of 90–250 nm around the granule. This area corresponds to the 0.1-μm zone from the edge of granules where GM1 and AnxA2 beads were concentrated (Fig. 1 D; also see Fig. 4 B)



**Figure 1. F-actin and GM1 colocalize in microdomains formed at exocytotic sites.** (A) Chromaffin cells were unstimulated (U) or stimulated for 10 min with nicotine (S) in the presence of anti-DBH antibodies and Alexa Fluor 633-conjugated cholera toxin. Cells were then fixed and labeled with TRITC-phalloidin and Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit antibodies to reveal DBH staining. Merged images were recorded in the same optical section. Bars, 10  $\mu\text{m}$ . Masks representing the colocalization area (phalloidin/cholera toxin or phalloidin/DBH) were generated by selecting the double-labeled pixels. (B) Semi-quantitative analysis of the percentage of F-actin colocalized with GM1 and exocytotic sites. Asterisks indicate statistical significance (\*\*\*,  $P < 0.001$ ) for medians (black line) determined using a Mann-Whitney test and the white line represents the mean ( $\pm$ SEM;  $n = 20$ ). Similar results were obtained on two culture preparations. (C) Distribution of GM1 and actin on plasma membrane sheets visualized by immunogold labeling and electron microscopy. Membrane sheets were prepared from untreated cells or cells stimulated with 20  $\mu\text{M}$  nicotine in the presence of biotinylated cholera toxin to detect external GM1. Cells were treated with 50  $\mu\text{M}$  latrunculin B where indicated. Membranes were then incubated with anti-actin antibodies revealed with anti-rabbit antibodies coupled to 10 nm gold particles and streptavidin coupled to 6 nm gold particles to reveal cholera toxin/GM1. Bars, 100 nm. (D) Histogram

and may constitute the dynamic platform in which protein and lipid diffusion is restricted (Saka et al., 2014).

#### **AnxA2 is present at GM1-enriched granule docking sites in nicotine-stimulated cells**

As AnxA2 is known to translocate to the cell periphery upon stimulation (Chasserot-Golaz et al., 2005; Umbrecht-Jenck et al., 2010), the distribution of AnxA2 and actin filaments on plasma membrane sheets obtained from unstimulated (Fig. 4 A) and nicotine-stimulated chromaffin cells were compared (Fig. 4 B). Double immunogold staining with anti-AnxA2 antibodies and phalloidin revealed that in unstimulated conditions, low AnxA2 and actin labelings were observed (Fig. 4 A), whereas in stimulated cells, AnxA2 colocalized with F-actin in clusters found at the anchoring base of docked granules (Fig. 4 B). Ripley's K-function statistical analysis indicated that AnxA2 and F-actin colocalized in domains whose radius was on the order of 80–120 nm (Fig. 4 C). This close association between AnxA2 and F-actin is consistent with the actin-binding properties of AnxA2 (Hayes et al., 2006).

In plasma membranes prepared from nicotine-stimulated cells, GM1/actin gold particles could also be observed in dark structures devoid of docked granules (Fig. 4 D). Since these structures were not seen in unstimulated cells, they could correspond to either docking sites from which granules had detached during the membrane sheet preparation or “pre-exocytotic sites” before granule recruitment. A triple immunolabeling of membrane sheets prepared from nicotine-stimulated chromaffin cells was performed using a combination of 6, 10, and 15 nm gold particles to covisualize GM1, S100A10, and AnxA2 (Fig. 4 E), or GM1, actin, and syntaxin-1 (Fig. 4 F). GM1-enriched microdomains formed in nicotine-stimulated cells also contained the AnxA2 tetramer (S100A10 and AnxA2), actin filaments, and the SNARE protein syntaxin1. Considering that AnxA2 is recruited close to syntaxin1 and Vamp2 (Umbrecht-Jenck et al., 2010), these AnxA2/GM1/actin domains could represent functional lipid domains corresponding to genuine “pre-exocytotic sites,” where secretory granules subsequently dock and fuse.

#### **AnxA2 bundles actin filaments to form GM1-enriched domains at exocytotic sites**

Upon its calcium-dependent binding to F-actin, AnxA2 undergoes a conformational change that induces self-association and bundling of actin filaments (Bharadwaj et al., 2013). To investigate whether AnxA2 modifies cortical actin dynamic and thereby mediates the formation of GM1 membrane domains in nicotine-stimulated cells, an AnxA2 mutant with impaired F-actin bundling activity was created (Jones et al., 1992). The actin binding and aggregating activities of AnxA2 wild type (AnxA2-WT) and AnxA2-K286A were first compared *in vitro* using GST-coupled recombinant proteins incubated with F-actin in the absence or presence of calcium. Calcium similarly increased the amount of F-actin pulled down by GST-AnxA2-WT and GST-AnxA2-K86A (Fig. 5 A), indicating that both proteins

were able to bind and aggregate F-actin in a calcium-dependent manner. However, the ultrastructure of F-actin/AnxA2 aggregates was quite different (Fig. 5 B). Large, linear actin filament bundles were observed with AnxA2-WT (Fig. 5 B, inset), whereas disorganized aggregates were observed with AnxA2-K286A, thus confirming that the mutant has lost its actin bundling activity.

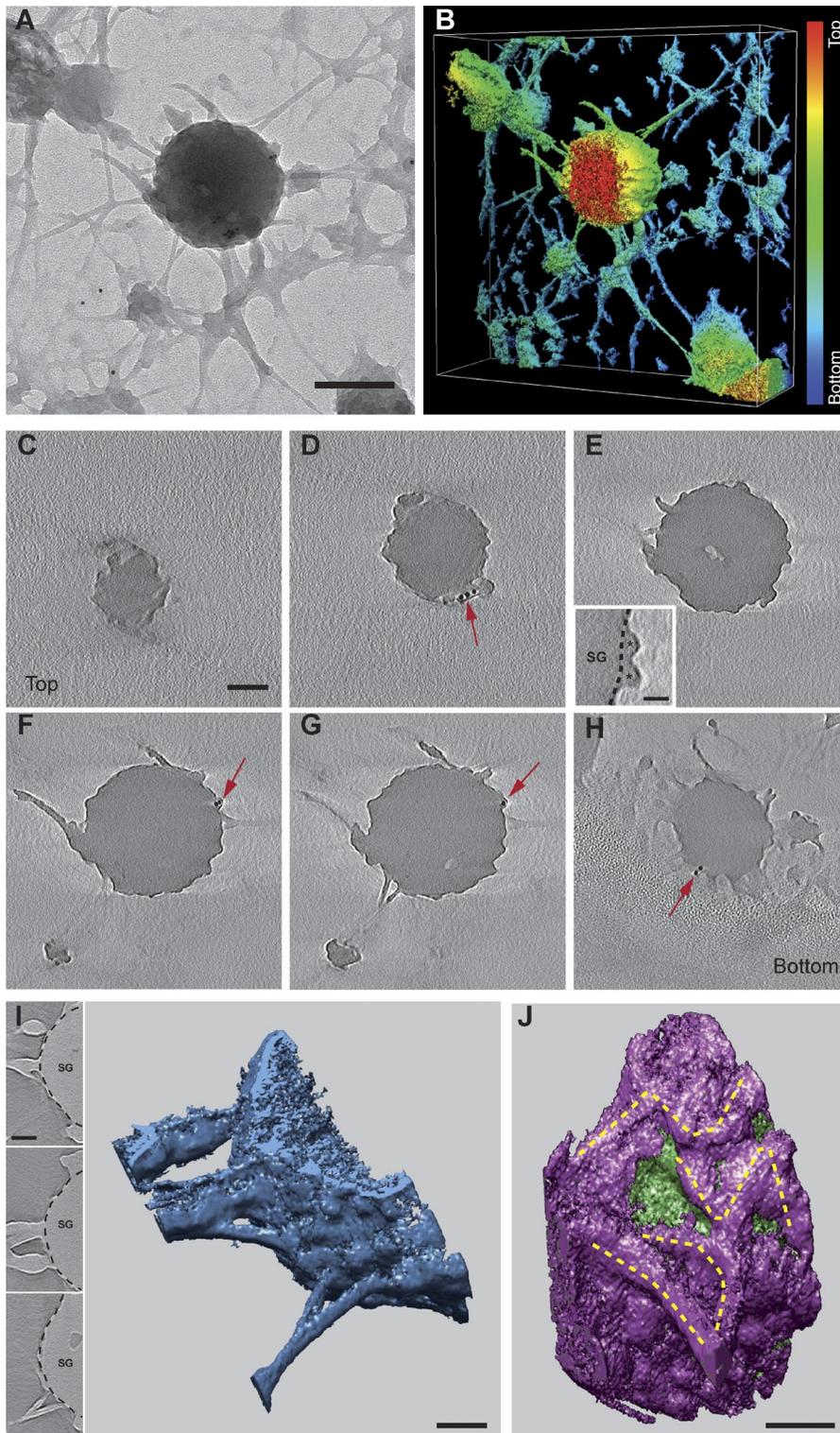
Thereafter, AnxA2-WT and AnxA2-K286A were expressed in chromaffin cells as C-terminal GFP fusion proteins to maintain their biochemical and functional properties (Zobiack et al., 2001; Rescher et al., 2008), and cells were stimulated with nicotine, in the presence of cholera toxin to visualize GM1 domain formation, and then stained with TRITC-phalloidin. As shown in Fig. 5 C, stimulation induced the translocation of WT and mutant AnxA2 proteins to the cell periphery, but compared with cells expressing the WT protein, very little cell surface binding of cholera toxin was observed in cells expressing AnxA2-K286A-GFP (Fig. 5 C). A semiquantitative analysis confirmed that AnxA2-K286A-GFP expression reduced both cholera toxin and F-actin labelings at the cell periphery (Fig. 5 D). Thus, the actin-bundling activity of AnxA2 seems essential to form and/or stabilize the GM1-enriched microdomains forming exocytotic sites in nicotine-stimulated cells.

Withaferin A (WA), a natural compound derived from plants, increases AnxA2 affinity for actin filaments and its F-actin-bundling activity (Falsey et al., 2006; Ozorowski et al., 2012). To support the assumption that AnxA2 mediates the formation of GM1 membrane domains by modifying cortical actin dynamics, the effects of WA on actin filaments and the formation of GM1 clusters were studied in nicotine-stimulated chromaffin cells. As shown in Fig. 6 (A and B), WA treatment increased the peripheral labeling of cholera toxin and phalloidin in nicotine-stimulated cells, suggesting that the actin-bundling activity of AnxA2 is linked to the formation of GM1-enriched microdomains at the plasma membrane. Indeed, electron tomography of plasma membrane sheets prepared from WA-treated cells confirmed the increase in cortical actin meshwork (Fig. 6 C). 3D tomographic representations of docked granules (Fig. 6 D and Video 2), side-views of tilt TEM series reconstructions of a docked granule (Fig. 6 E), and plot profiles (Fig. 6, F–I) all clearly revealed an increase in thickness of the actin coat and bundles connecting secretory granules to the plasma membrane. All together, these results suggest that AnxA2 mediates the formation of GM1 microdomains through its actin-bundling activity, thereby forming exocytotic sites in nicotine-stimulated cells.

#### **AnxA2 F-actin-bundling activity is involved in secretory granule recruitment and fusion during exocytosis**

The involvement of AnxA2 F-actin-bundling activity in catecholamine release was investigated using carbon fiber amperometry to determine the frequency and kinetics of individual exocytotic events (Poëa-Guyon et al., 2013; Table 1). Fig. 7 A

representing the relative distribution of 6 nm and 10 nm gold particles according to their distance from a granule (error bars indicate  $\pm$ SEM;  $n = 40$  images). The distance and number of particles were determined manually. Note that GM1-bound particles and actin-bound particles are concentrated within 0.1  $\mu$ m from the granule edge. A significant number of actin-bound particles were located on the granules (<25 nm away). (E) Bivariate K-function analysis of double-labeled membranes. Images obtained in unstimulated (15) and nicotine-stimulated (20) cells were analyzed. Values of  $L(r)$ -r greater than the 95% CI indicated the significant coclustering of actin and GM1. (F) Spatial point pattern analysis of GM1 labeling. For each condition, 30 images were analyzed and experiments were performed on two different cell cultures. Values of  $L(r)$ -r greater than the 95% CI indicated significant GM1 clustering in nicotine-stimulated cells, whereas a random pattern was seen in untreated cells and nicotine-stimulated cells treated with latrunculin B.

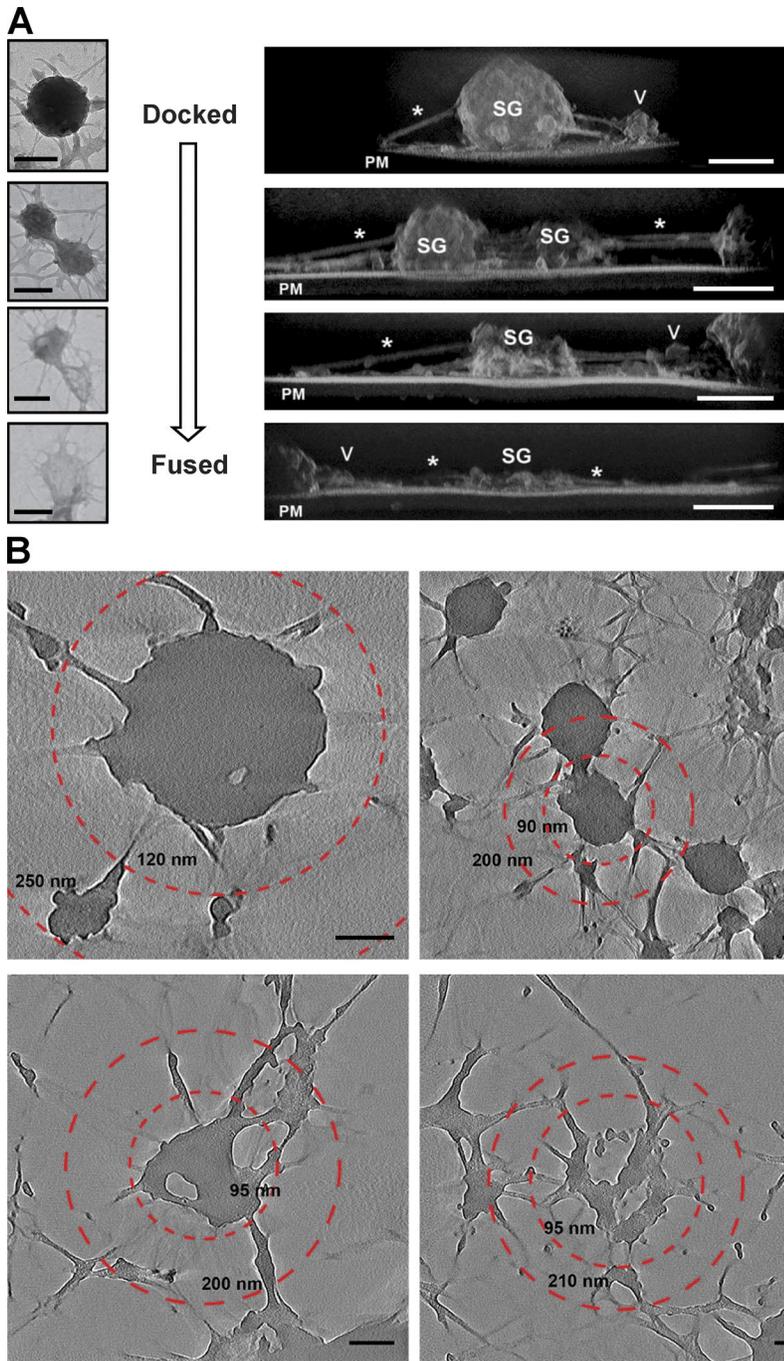


**Figure 2. Electron tomography of the cortical actin network surrounding secretory granules docked at the plasma membrane.** (A) Electron micrograph showing a plasma membrane prepared from a nicotine-stimulated cell. Secretory granules docked at the plasma membrane were surrounded by a filamentous network. (B) A 3D model of the granule in A showing the close interaction between docked secretory granules and the cortical F-actin network covering the inner face of the plasma membrane. False colors were applied using a color code related to the topographic height (shown on the right), with the plasma membrane sheets as the lowest plane (Video 1). (C–H) Series of tomographic slices of the docked granule in A. The first (Top) and last sections (Bottom) correspond, respectively, to the farthest and closest parts of the docking region of secretory granules at the plasma membrane. Actin colloidal gold immunostaining (arrows) served as a fiducial marker for image alignment during tomographic reconstruction. The inset in E is a 2.5 $\times$  enlargement of the granule whose limit is shown as a broken black line. The asterisks indicate the protrusions that correspond to anchored F-actin. SG, secretory granule. (I) Surface-rendered view of a subtomogram corresponding to an equatorial section of the granule shown in A. The 3D representation is associated with the three tomographic sections (left) showing different branched anchoring structures that are connected to the granule. (J) Surface-rendered view of a subtomogram corresponding to a longitudinal section of the granule shown in A. The volume eraser tool in UCSF Chimera was used to perform curettage inside the granule until reaching the membrane. The topography of the granule surface is displayed in purple. The excess removed by curettage is shown in green. The path followed by the actin filaments is represented by the broken yellow lines. Bars: (A) 200 nm; (C) 100 nm; (E, inset) 25 nm; (I and J) 25 nm.

shows representative amperometric traces recorded from chromaffin cells expressing AnxA2-K286A or treated with WA. AnxA2-K286A decreased the frequency of the amperometric events by 60%, whereas WA increased it (Fig. 7 B), suggesting that the actin filament-bundling activity of AnxA2 partly controls the number of secretory granules undergoing exocytosis.

Thereafter, the shape of individual amperometric spikes was analyzed. Each spike represents a single granule fusion event with a surface area or quantal size that is proportional to

the amount of catecholamine released per event, with the spike height (amplitude) reflecting the maximal flux of catecholamine, the half-width reflecting the duration of the exocytotic event, and the rise time reflecting the kinetics of the fusion pore expansion (Fig. 7 C). Both AnxA2-K286A and WA affected some of these spike parameters (Fig. 7 D). Although the quantal size of the spikes was not affected, the half-width, the mean spike amplitude, and the spike rise time were modified in cells expressing AnxA2-K286A or treated with WA. Note that WA,



**Figure 3. Spatial organization of actin filaments connecting secretory granules to the plasma membrane.** (A) TEM images at zero tilt of a docked secretory granule and a series of secretory granules at different stages of fusion (left) and the corresponding clipping plane of the side view of the isosurface representation of their tomogram (right). Actin cytoskeleton favoring exocytosis (asterisks) of secretory granules (SG) is clearly linked to the plasma membrane (PM) through specific associated-membrane structures (V). Bars, 200 nm. (B) Slices through a tomogram of docked and fusing secretory granules. Red broken circles define an area of 90–250 nm around the granules, wherein anchor points for cortical actin at the plasma membrane were systematically localized. Bars, 100 nm.

which potentially increases the F-actin–bundling activity of endogenous AnxA2, and AnxA2-K286A devoid of F-actin–bundling activity had opposite effects on these spike parameters.

Amperometric spikes are often preceded by the so-called prespike foot (PSF) currents, believed to reflect the slow release of catecholamines through an initial narrow fusion pore, before its subsequent rapid expansion that gives rise to the spike. Significant changes in PSF parameters were also observed (Fig. 8 and Table 1). Chromaffin cells expressing AnxA2-K286A exhibited significantly longer PSF ( $24.3 \pm 2.1$  ms versus  $15.7 \pm 2.1$  ms in nontransfected cells) and an increase in foot charge (+30%), whereas WA-treated cells showed shorter and smaller PSF. Thus, these amperometric data are consistent with a role for AnxA2-dependent actin filament-bundling activity in

the recruitment of secretory granules (number of exocytotic events), and possibly in the stabilization of the nascent fusion pore and its enlargement, thereby allowing full fusion in the late stage of exocytosis.

Finally, to address the causal relationship between AnxA2-induced actin bundling and granule recruitment and docking, we counted the number of docked granules on membrane sheets prepared from stimulated chromaffin cells expressing either AnxA2-WT or AnxA2-K286A. Immunogold labeling of GFP (25 nm gold particles) was used to identify membrane sheets of transfected cells. As illustrated in Fig. 9, the number of docked granules was higher in stimulated than in resting cells ( $0.08$  and  $0.022$  granules/ $\mu\text{m}^2$ , respectively) in cells that were not transfected or in cells expressing AnxA2-WT. However, the

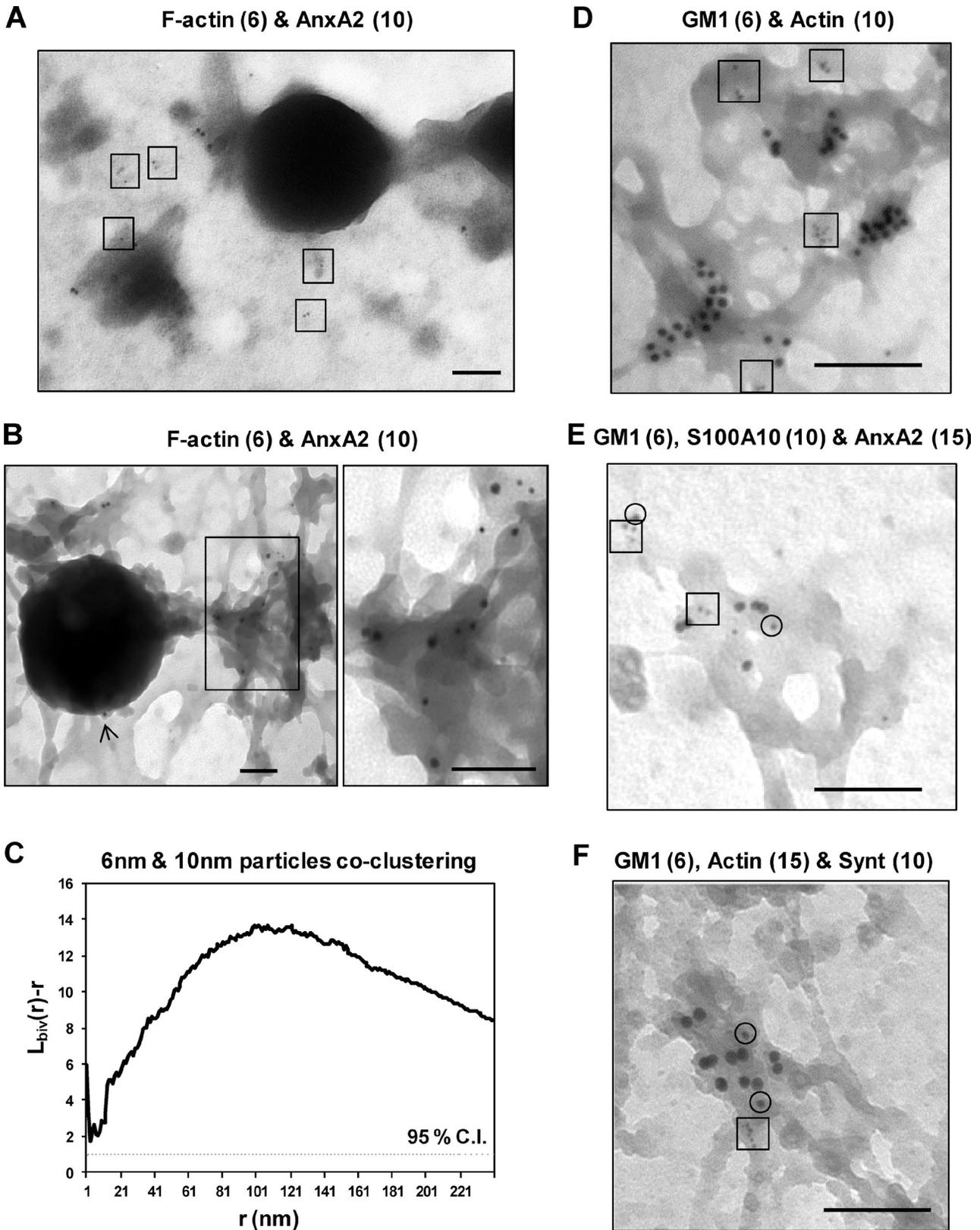
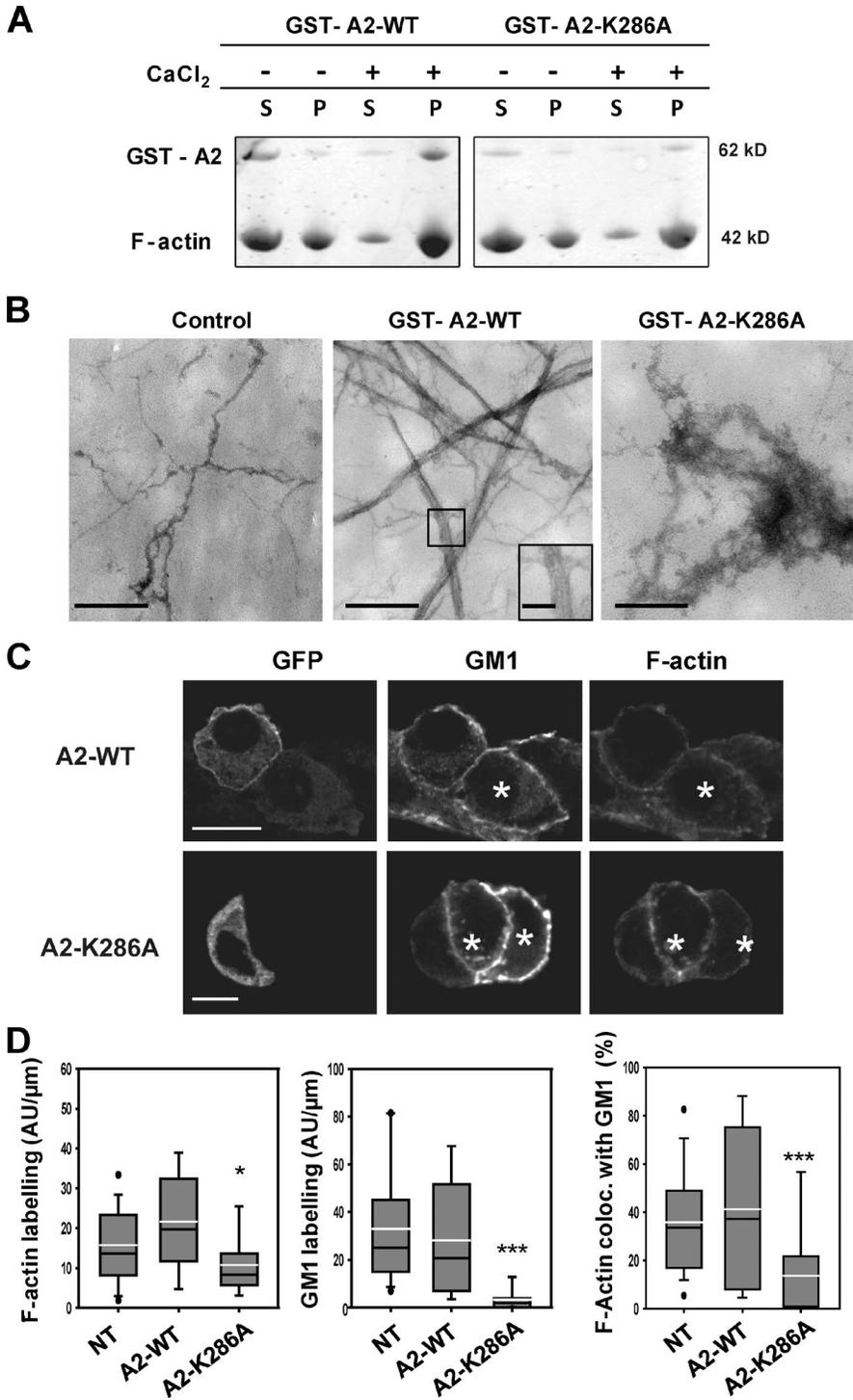


Figure 4. **GM1-enriched domains formed at the plasma membrane in nicotine-stimulated cells contain the AnxA2 tetramer, actin filaments, and SNARE proteins.** (A and B) Double staining of AnxA2 (10 nm gold particles) and phalloidin (6 nm gold particles) on plasma membrane sheets prepared from unstimulated (A) and nicotine-stimulated cells (B). The right panel in B shows a higher magnification of the region delimited by the rectangle. Note that AnxA2 is also present on the docked granule surface (arrowhead). (C) Bivariate K-function analysis of double-labeled membranes ( $n = 44$  images). Values of  $L(r)-r$  greater than the 95% CI indicated the significant colocalization of F-actin and AnxA2 in nicotine-stimulated chromaffin cells. (D) Spatial distribution of GM1 (6 nm gold particles, squares) and actin (10 nm gold particles) on the plasma membrane from a nicotine-stimulated cell. (E and F) Plasma membrane sheets from nicotine-stimulated cells stained for either GM1 (6 nm gold particles, squares)/S100A10 (10 nm gold particles, circles)/AnxA2 (15 nm gold particles) or GM1 (6 nm gold particles, squares)/actin (15 nm gold particles)/syntaxin (10 nm gold particles, circles). Bars, 100 nm.

Downloaded from jcb.rupress.org on June 7, 2016



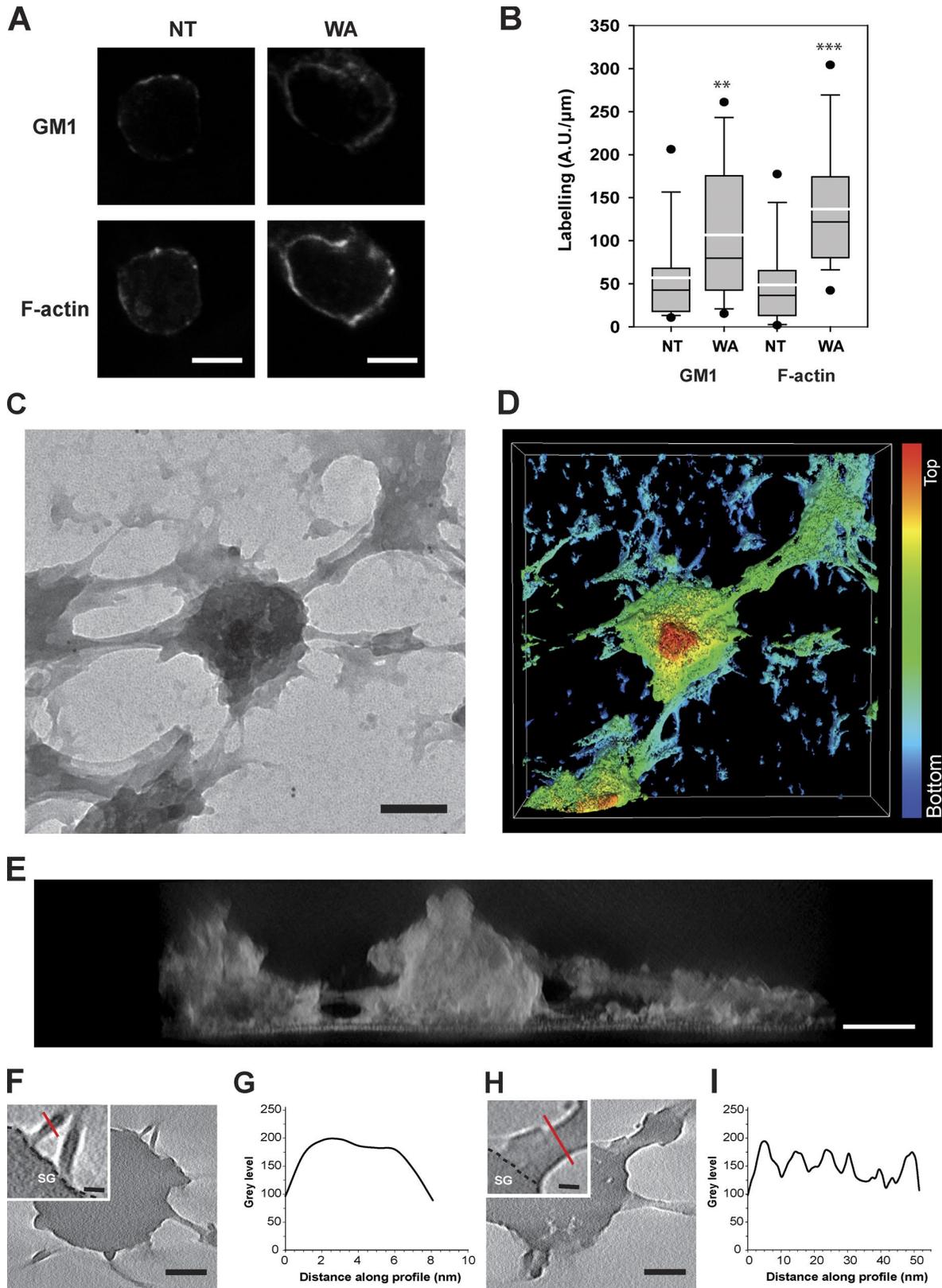
**Figure 5. The actin-bundling activity of AnxA2 is linked to the formation of GM1-enriched domains in stimulated cells.** (A) F-actin binding assay of recombinant GST-AnxA2 WT and GST-AnxA2 K286A in the absence and presence of calcium. Purified recombinant AnxA2 proteins fused with GST (4  $\mu$ M) were incubated with preformed actin filaments (18  $\mu$ M) for 30 min at room temperature. After low-speed centrifugation, the supernatant (S) and pellet (P) were collected and separated on a 4–20% SDS-PAGE-gel. (B) Electron microscopic visualization of recombinant AnxA2/F-actin aggregates. Before centrifugation, a 5- $\mu$ l aliquot was spread on electron grids and prepared for electron microscopy. The inset shows a higher magnification of the region delimited by the square. (C) Cells expressing AnxA2-WT-GFP or AnxA2-K286A-GFP were stimulated with 59 mM K<sup>+</sup> in the presence of fluorescent cholera toxin to visualize GM1-enriched domains, then fixed and stained with TRITC-phalloidin. Confocal images were recorded in the same optical section. Asterisks indicate nontransfected cells. (D) Semi-quantitative analysis of cholera toxin (GM1) and F-actin labeling in nicotine-stimulated cells expressed in arbitrary units ( $\pm$ SEM;  $n = 20$ ). Statistical significance for medians (black line) was determined using a Mann-Whitney test. Asterisks indicate statistical significance (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ) and the white lines represent the means. Similar results were obtained on three culture preparations. Bars: (B, main panels) 500 nm; (B, inset) 100 nm; (C) 10  $\mu$ m.

number of docked granules was reduced by nearly 70% in stimulated cells expressing AnxA2-K286A. This decrease was in the same range as the reduction of amperometric events observed in AnxA2-K286A-expressing cells (Fig. 7 B). The tomogram side view of a docked granule in cells expressing AnxA2-K286A revealed a disorganization of actin on the granule, an absence of actin bundles connecting granules to the plasma membrane, and no positive curvature of the plasma membrane under the docked granule (Fig. 9 B). Additionally, in chromaffin cells treated with WA, there was an increase in the number of docked granules (Fig. 9), in line with the increase in the number of amperometric

events (Fig. 7 A). Altogether, these results strongly reinforce the idea that AnxA2 promotes the formation of actin bundles that anchor secretory granules to the plasma membrane and regulate the kinetics of fusion.

## Discussion

AnxA2 is a prominent and well-studied member of the annexin family of Ca<sup>2+</sup>-dependent membrane-binding proteins known to be involved in several cellular processes including secretion



**Figure 6. WA stimulates the formation of GM1-enriched domains and thickens actin bundles connecting secretory granules to the plasma membrane in nicotine-stimulated cells.** (A) Confocal micrographs of cells treated for 1 h with 3  $\mu\text{M}$  WA and stimulated with 10  $\mu\text{M}$  nicotine in the presence of cholera toxin. Cells were then fixed and labeled with rhodamine-conjugated phalloidin to visualize F-actin. (B) Semi-quantitative analysis of cholera toxin and F-actin labeling expressed in arbitrary units ( $\pm$ SEM;  $n = 15$ ). Statistical significance for medians (black line) was determined using a Mann-Whitney test. The asterisks indicate statistical significance (\*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ) and the white lines represent the means. Similar results were obtained in two independent experiments performed on two culture preparations. (C) Electron micrographs of plasma membrane sheets prepared from nicotine-stimulated

in many cell types (Bharadwaj et al., 2013). Most of its cellular functions are related to the calcium-dependent phospholipid-binding properties. Yet, AnxA2 also displays an actin-binding and bundling activity whose functional importance within cells remains poorly understood. In neuroendocrine chromaffin cells, AnxA2 translocates from the cytosol to the plasma membrane upon cell stimulation, promoting the formation and/or stabilizing the lipid microdomains required for structural and spatial organization of the exocytotic machinery (Chasserot-Golaz et al., 2005; Umbrecht-Jenck et al., 2010). In this study, we show that AnxA2-mediated actin bundles form GM1-enriched lipid microdomains at the plasma membrane, where syntaxin-1 and docked granules were observed. At these presumed exocytotic sites, actin bundles coat and anchor granules to the plasma membrane. Functional studies performed using amperometry indicate that the AnxA2-dependent actin-bundling activity controls the number of docked granules and exocytotic events, and somehow provides a driving force that promotes fusion pore expansion and granule cargo release. This is the first report describing the 3D actin cytoarchitecture at the site of exocytosis, and establishing a role for the AnxA2-dependent actin bundling activity in the pathway underlying secretion.

#### Actin bundles anchor docked granules to the plasma membrane

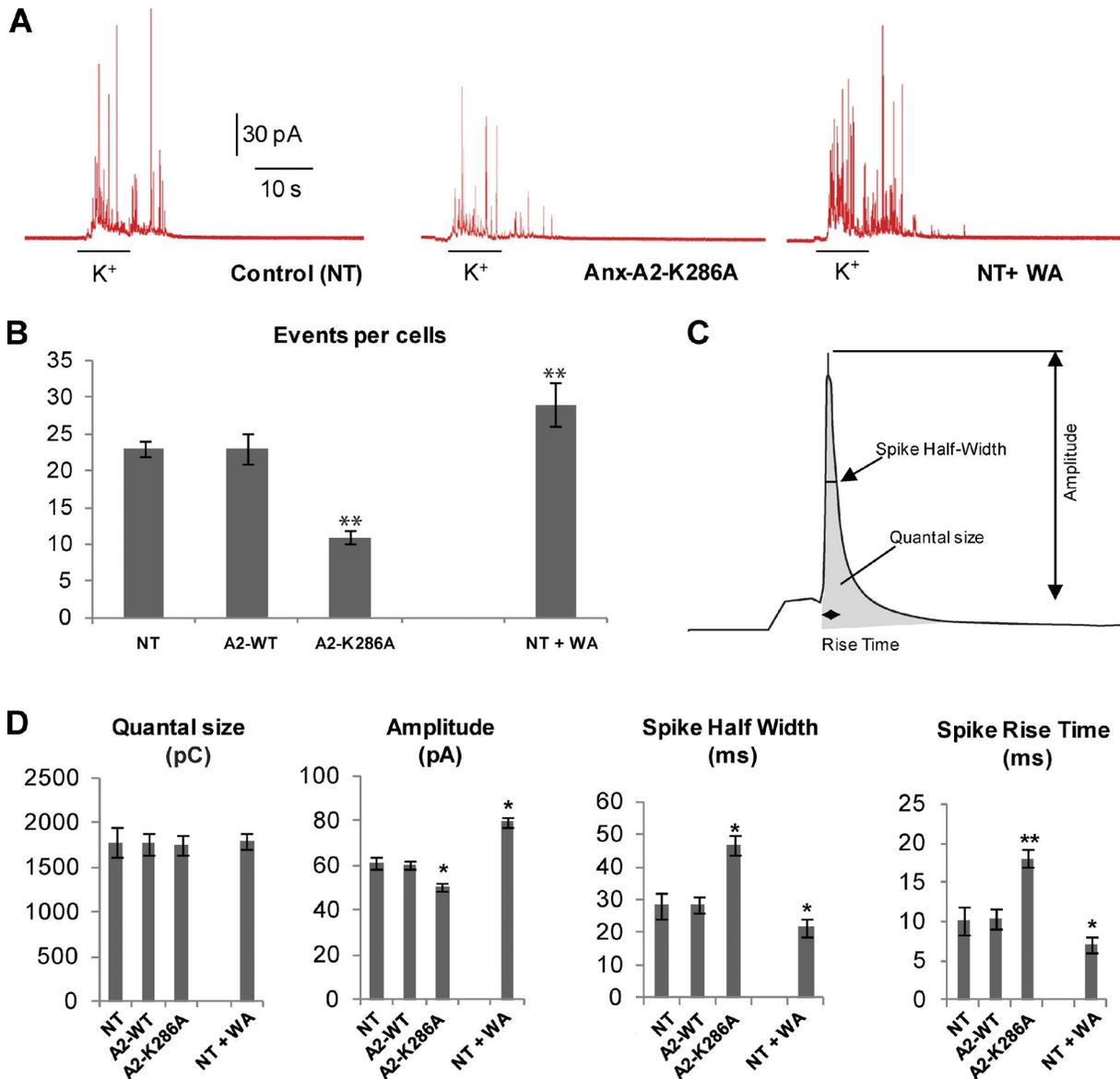
Actin is well known to influence some of the many steps leading to exocytosis in neuroendocrine cells. Until recently, the widely accepted view was that the cortical actin network acts essentially as a physical barrier to prevent granule access to the cell surface. However, such a housekeeping function for actin is inconsistent with several functional studies suggesting an active role for actin in the exocytotic machinery (for reviews see Malacombe et al., 2006; Gutiérrez, 2012). For instance, actin filaments in association with myosins participate in the transport and guiding of secretory granules to their fusion sites (Papadopoulos et al., 2013a,b; Tomatis et al., 2013). Actin has also been proposed to play a positive role in late stages of exocytosis by controlling the fusion pore and specifying kiss and run versus full exocytosis (Gutiérrez, 2012) and/or by directly expelling secretory content (Miklavc et al., 2012). Thus, it is now clear that exocytosis cannot occur without a minimal actin cytoskeletal structure, although the presence and organization of actin at the sites of exocytosis has never been observed before and has been highly speculative. Here, we provide the first detailed electron tomography analysis of the fine structure of actin filaments present at exocytotic sites under close-to-native conditions. Images of the 3D arrangement of the cytoskeleton entrapping secretory granules docked at the plasma membrane revealed that actin filaments coat docked granules and form bundles connecting granules to the plasma membrane. Our results support the notion that the F-actin cytoarchitecture organizes different components of the secretory machinery to shape

exocytosis in neuroendocrine cells (Gutiérrez, 2012). The origin of this actin-based docking machinery in stimulated cells is not known. The actin-bundling activity of AnxA2 appears to account, at least in part, for the actin bundles anchoring granules to the plasma membrane. However, actin filaments may also be synthesized de novo onsite by local adaptor molecules described to be present at exocytotic sites such as N-Wasp and Arp2/3 (Gasman et al., 2004) or Rab27A and MyRip (Desnos et al., 2003), or represent residual polymerized actin persisting at granule docking sites after secretagogue-induced cortical actin rearrangements.

#### Actin-bundling activity of AnxA2 is required for the formation of GM1-enriched granule docking sites

GM1/cholesterol/PI(4,5)P<sub>2</sub>-enriched lipid microdomains are required for efficient SNARE-mediated granule docking and fusion with the plasma membrane (Aoyagi et al., 2005; Lang, 2007). Yet, the lateral diffusion rate of cholesterol and PI(4,5)P<sub>2</sub> within the lipid bilayer is probably much faster than their local biosynthesis rate, suggesting that lipid microdomain clustering and formation depend on diffusion barriers provided by proteins. AnxA2 has been proposed for this putative role because the formation of GM1/cholesterol/PI(4,5)P<sub>2</sub> clusters in stimulated chromaffin cells requires the translocation of AnxA2 to the plasma membrane (Chasserot-Golaz et al., 2005) and AnxA2 has been found to be recruited to SNARE clusters at the plasma membrane (Umbrecht-Jenck et al., 2010). However, although the protein has the physical properties necessary for organizing lipid clusters (Drücker et al., 2013), mechanisms by which AnxA2 forms a specific lipid environment at granule docking sites need to be elucidated. We showed here that, in nicotine-stimulated cells, the actin-bundling activity of AnxA2 promotes the formation of GM1-enriched microdomains at the plasma membrane, increases the number of morphologically docked granules at the plasma membrane, and controls the number of individual exocytotic events. Thus, AnxA2-dependent actin bundles participate in the spatial organization of the plasma membrane, providing active sites for secretory granule docking and exocytotic fusion. These observations highlighting new functions for the actin cytoskeleton in regulated exocytosis are consistent with a recent report showing that F-actin interferes with SNAP-25 patch mobility and significantly influences the probability of fusion of associated secretory granules (Torregrasa-Hetland et al., 2013). Yet, AnxA2-mediated actin bundles could also promote docking through the formation of the specific lipid environment required for SNARE complex formation or stabilize granules captured by minimal tethering machinery and prevent them from rapidly undocking (Toonen et al., 2006). Understanding the precise mechanism by which AnxA2-generated actin bundles contribute to the docking machinery and thereby accelerate vesicle fusion is clearly the next challenge.

and WA-treated cells labeled with anti-actin antibodies and immunogold. (D) 3D model of the same secretory granule showing the bundling effect of WA on the actin network anchored to the granule surface. False colors were applied using a color-coded surface related to the topographic height on the right (Video 2). (E) Clipping plane of the side view of the isosurface representation of a tomogram showing an increase in the actin network anchored to the granule surface in a WA-treated cell. (F–I) Central tomographic section of a docked secretory granule and corresponding enlargement (inset, 2.5× zoom) showing anchored actin filaments and the granule surface marked with a dotted black line. Graphs (G and I) represent a plot profile along the red line perpendicular to the actin filament. Images were obtained from control (F) and WA-treated (H) cells stimulated with nicotine. Plot profiles presented are representative of several measurements ( $n = 15$  for each plot profile) from different tomograms ( $n = 3$  for each conditions). Individual 10-nm actin filaments anchored granules in control cells, whereas large actin bundles consisting of at least five actin filaments were observed in WA-treated cells. Bars: (A) 5  $\mu$ m; (C) 200 nm; (E, F and H, main panels) 100 nm; (F and H, insets) 25 nm.

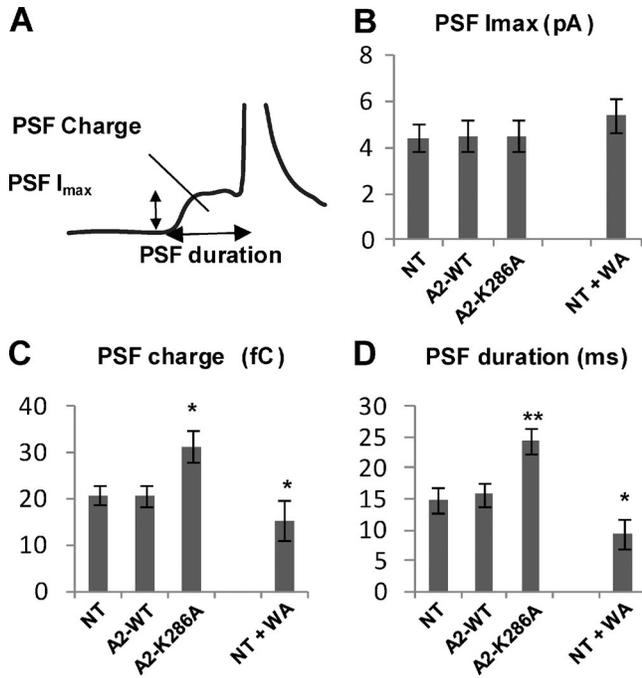


**Figure 7. The actin-bundling activity of AnxA2 is involved in granule recruitment and fusion.** Chromaffin cells were stimulated with a local application of 100 mM KCl for 10 s, and catecholamine secretion was monitored using carbon fiber amperometry. Control release was measured in nontransfected cells from the same culture dish. (A) Typical amperometric recordings obtained in nontransfected cells (NT), cells expressing AnxA2-K286A-GFP, and cells treated for 1 h with 5  $\mu$ M WA. (B) The number of amperometric spikes per cell recorded in nontransfected cells (NT), cells transfected with AnxA2-WT-GFP (A2-WT) or AnxA2-K286A-GFP (A2-K286A), or WA-treated cells (NT+WA). Results represent the mean  $\pm$  SD (error bars) from 25–55 cells. (C) Schema showing the different spike parameters of the amperometric response (means  $\pm$  SEM) measured in D. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ .

### Actin-bundling activity of AnxA2 affects the kinetics of catecholamine release

Amperometric recordings revealed that the AnxA2 F-actin-bundling activity was not only linked to the formation of exocytotic platforms and the number of morphological docked granules, but also to the kinetics of the exocytotic event itself. Indeed, the AnxA2 actin-bundling activity was correlated with the spike rise time, amplitude, and half-width, suggesting a possible link between the AnxA2-induced actin architecture and the flux of catecholamine release. AnxA2 contains a stretch of nine amino acids (residues 286–294) in its carboxy-terminal core that is remarkably similar to the actin-binding site of the myosin S-1 heavy chain (Jones et al., 1992). In nonneuronal cell types, actin coat contraction and myosin II have been proposed to compress fused granules for active extrusion of nonsoluble, bulky granu-

lar contents (Miklavc et al., 2012). In chromaffin cells, myosin II inhibition increases amperometric spike half-widths without changing quantal size (Berberian et al., 2009). Thus, to some extent, the role of AnxA2 seems to be close to that of myosin II. However, AnxA2 actin-bundling activity also affected the charge and lifetime of PSF, suggesting a functional link between AnxA2/actin and the characteristics of the early fusion pore, a role that has not been proposed for myosin II (Berberian et al., 2009). In fact, tension in the membrane is thought to favor fusion pore formation or expansion (Monck et al., 1991). By providing actin filament bundles at granule docking sites, AnxA2 could induce membrane deformation, possibly reflected by the positive curvature of the plasma membrane observed here under docked granules (Fig. 3 A). Furthermore, cholesterol depletion has been shown to decrease PSF duration (Cookson



**Figure 8. The actin-bundling activity of AnxA2 modulates the formation of the initial fusion pore.** (A) Schema showing the parameters of the PSF signal measured in B, C, and D panels. NT, nontransfected cells; A2-WT, cells transfected with AnxA2-GFP WT; A2-K286A, cells transfected with AnxA2-K286A-GFP; NT + WA, cells treated for 1 h with 5  $\mu$ M WA. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (error bars). \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ .

et al., 2013), suggesting that AnxA2 could also regulate fusion pore formation through its lipid segregation activity (Drücker et al., 2013) and its capacity to organize the GM1/cholesterol/PI(4,5)P<sub>2</sub>-enriched exocytotic sites at the plasma membrane (Chasserot-Golaz et al., 2005; Umbrecht-Jenck et al., 2010).

To conclude, AnxA2 plays a central role in neuroendocrine secretion, coordinating lipid microdomain formation, both spatially and temporally, with actin filament bundling necessary for efficient fusion and granule cargo release. The AnxA2-induced microdomains are likely to be important for many fundamental biological processes requiring membrane dynamics ranging from cell differentiation to cell migration and secretion (Hitchcock et al., 2014; Astro and de Curtis, 2015).

## Materials and methods

### Antibodies and reagents

Rabbit polyclonal antibodies directed against AnxA2 (p36) purified from bovine aorta were diluted 1:200 (a gift from J.C. Cavadore, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U-249, Paris, France). Rabbit polyclonal antibodies directed against DBH (EC.1.14.17.1) purified from bovine chromaffin granules were diluted 1:75 to specifically label secretory granules in chromaffin cells (Chasserot-Golaz et al., 1996). Mouse monoclonal antibodies directed against syntaxin, TRITC-conjugated phalloidin, and Latrunculin B were from Sigma-Aldrich. Mouse monoclonal antibodies directed against GFP (clones 7.1 and 13.1) were from Roche. Secondary goat anti-rabbit and anti-mouse antibodies and streptavidin coupled to Alexa Fluor conjugates (488, 555, or 647) or gold particles were from Molecular Probes (Invitrogen) and Aurion, respectively. Fluorescent cholera toxin B subunit coupled

to Alexa Fluor 633 or 555 were from Molecular Probes (Thermo Fisher Scientific), and WA was from Calbiochem inhibitors (EMD Millipore).

### Chromaffin cells

Chromaffin cells were isolated from fresh bovine adrenal glands. In brief, glands were perfused with calcium-free Locke's solution (140 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 11 mM glucose, 0.56 mM ascorbic acid, and 15 mM Hepes, pH 7.5) containing 0.1% *Clostridium histolyticum* collagenase (Boehringer Ingelheim) and 0.5% BSA. Then, the medullae were dissected and further dissociation of chromaffin cells was achieved by passing the cells through a nylon sieve (120  $\mu$ m pore size). Cells were collected in calcium-free Locke's solution and purified on self-generating Percoll gradients and maintained in culture as described previously (Bader et al., 1986). To induce exocytosis, chromaffin cells were washed twice with Locke's solution (140 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 11 mM glucose, 0.56 mM ascorbic acid, 0.01 mM EDTA, and 15 mM Hepes, pH 7.5) then stimulated with Locke's solution containing 20  $\mu$ M nicotine or depolarizing solution (Locke's solution adjusted to 59 mM K<sup>+</sup>).

### DNA constructs and cell transfection

Human recombinant AnxA2 was inserted in BglIII- and SalI-digested pEGFP-N3 (Rescher et al., 2000); this plasmid was provided by V. Gerke (Institute for Medical Biochemistry, Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung, University of Munster, Germany). AnxA2-K286A-GFP mutant was generated using a QuikChange mutagenesis kit (Agilent Technologies) and the following oligonucleotides (forward, 5'-AAGGGGACGCGAGATGCGTCTGATCAGAATC-3'; reverse, 5'-GATTCTGATCGAGACCGCATCTCGCTCCCTT-3'; bold nucleotides indicate changes in the sequence compared to WT). AnxA2 WT and AnxA2-K286A were subcloned in BglIII- and SalI-digested pGEX4T1. Constructs were verified by DNA sequencing (GATC Biotech). GST-AnxA2 WT and GST-AnxA2-K286A were produced in BL21 *E. coli* and purified on glutathione-Sepharose beads (GE Healthcare) as described previously (Vitale et al., 1996). The purity was estimated at 98% by Coomassie blue staining of SDS-PAGE gels. Plasmids (3  $\mu$ g) were transfected into chromaffin cells ( $5 \times 10^6$  cells) by electroporation (Amaxa Nucleofactor systems; Lonza) according to the manufacturer's instructions. Electroporated cells were immediately recovered in warm culture medium and plated onto fibronectin-coated glass coverslips. Experiments were performed 48 h after transfection.

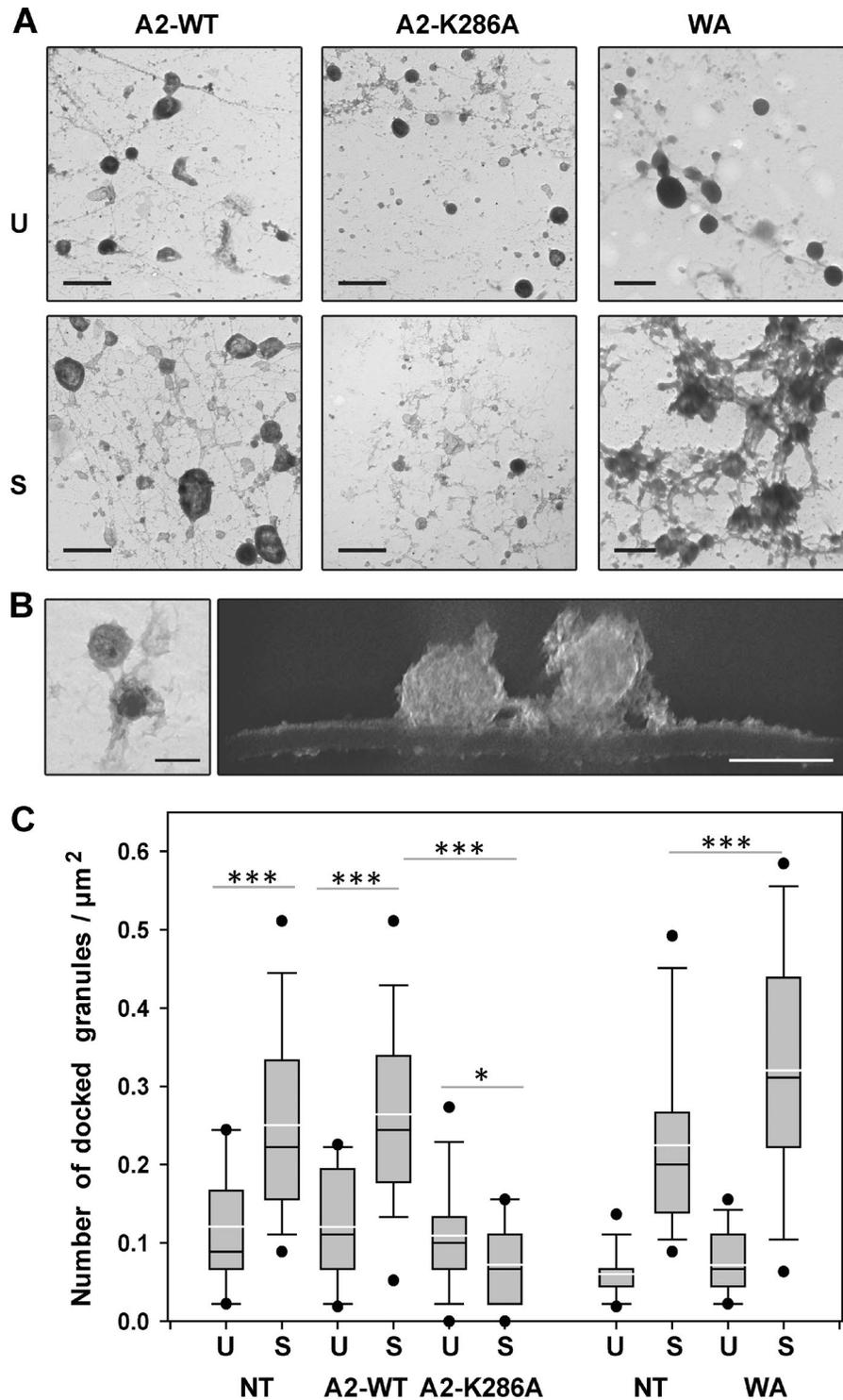
### In vitro F-actin binding experiments

The F-actin-bundling activity of recombinant GST-AnxA2 (WT and K286A) was tested in vitro using the nonmuscle actin binding protein Spin-Down Biochem kit (catalogue no. BK013; Cytoskeleton, Inc.). F-actin binding proteins cosediment with actin aggregates in the pellet (14,000 g, 1 h). The distribution of the protein in the supernatants and pellets was analyzed by SYPRO Orange staining on SDS-PAGE gels (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific).

Formation of actin bundles was assessed by electron microscopy (Ikebuchi and Waisman, 1990). Before centrifugation, aliquots (5  $\mu$ l) were spread on electron grids and negatively stained with 1% uranyl acetate, and aggregates were observed using a transmission electron microscope (7500; Hitachi).

### Immunofluorescence and confocal microscopy

For immunocytochemistry, chromaffin cells, grown on fibronectin-coated glass coverslips, were fixed and labeled as described previously (Chasserot-Golaz et al., 1996). GM1 was labeled on live chromaffin cells incubated for 10 min with 8  $\mu$ g/ml fluorescent cholera



**Figure 9. AnxA2 forms the actin bundles that anchor the secretory granules at the plasma membrane during exocytosis.** (A) Electron micrograph plasma membrane sheets prepared from unstimulated or stimulated cells transfected with AnxA2-WT-GFP (A2-WT) or AnxA2-K286A-GFP (A2-K286A), or nontransfected cells treated with WA (NT+WA). Transfected cells were labeled with anti-GFP antibodies revealed with 25 nm gold particles. Bars, 500 nm. (B) TEM image at zero tilt of a secretory granule docked on the plasma membrane of a cell transfected with AnxA2-K286A-GFP (left) and the clipping plane of the side view of the isosurface representation of the tomogram (right). Bars, 200 nm. (C) The number of granules morphologically docked on plasma membrane sheets of unstimulated (U) and stimulated (S) cells, nontransfected cells (NT), cells transfected with AnxA2-WT-GFP (A2-WT) or AnxA2-K286A-GFP (A2-K286A), or cells treated with WA (NT+WA). Results indicate  $\pm$ SEM from 25–50 images. Asterisks indicate statistical significance (\*\*\*,  $P < 0.001$ ) for medians (black line) determined using a Mann-Whitney test, the white lines represent the means. Images were acquired from three different culture preparations.

toxin B subunit (coupled with Alexa Fluor 633 or Alexa Fluor 555) in Locke's solution with or without 20  $\mu\text{M}$  nicotine. The transient accessibility of DBH to the plasma membrane of chromaffin cells was tested by incubating cells for 10 min in Locke's solution containing 20  $\mu\text{M}$  nicotine and anti-DBH antibodies diluted to 1:75. F-actin was stained with TRITC-conjugated phalloidin (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 15 min in the dark at room temperature. Cells were then mounted in Moviol (Hoechst) and visualized using a confocal microscope (SP5II; Leica) equipped with a Plan-Apochromat oil immersion objective lens (63 $\times$ , NA 1.4). The proportion of colocalization was estimated from the double-labeled pixels

using ICY software (<http://icy.bioimageanalysis.org/>). The amount of cholera toxin or TRITC-phalloidin associated with the plasma membrane was measured and expressed as the mean fluorescence intensity normalized to the corresponding surface area, and divided by the total perimeter of each cell. This allowed a quantitative cell-to-cell comparison of the fluorescence detected in cells.

**Amperometry**

Bovine chromaffin cells were transfected with plasmids encoding GFP-tagged AnxA2 WT or mutant and seeded in Petri dishes. After 48 h,

cells were washed with Locke's solution and catecholamine secretion was evoked by applying 100 mM K<sup>+</sup> in Locke's solution without ascorbic acid for 10 s to single cells by means of a glass micropipette positioned at a distance of 30–50 μm from the cell. Electrochemical measurements of catecholamine secretion were performed using 5-μm-diameter carbon fiber electrodes (ALA Scientific Instruments) held at a potential of 650 mV compared with the reference electrode (Ag/AgCl) and approached closely to the recorded cells essentially as described previously (Poëa-Guyon et al., 2013). Amperometric recordings were performed with an amplifier (AMU130; Radiometer Analytical), sampled at 5 kHz, and digitally low pass filtered at 1 kHz. Analysis of amperometric recordings were performed with a macro (obtained and freely available from R. Borges laboratory [Analysis program 3.3], written for Igor software; WaveMetrics), allowing automatic spike detection and extraction of spike parameters (Segura et al., 2000). The number of amperometric spikes was counted as the total number of spikes with an amplitude >5 pA and time-to-peak >35 ms within 60 s.

### Plasma membrane sheet preparation and scanning for electron microscopy

Cytoplasmic face-up membrane sheets were prepared and processed as described previously (Umbrecht-Jenck et al., 2010). In brief, carbon-coated Formvar films on nickel electron grids were inverted onto unstimulated or nicotine-stimulated chromaffin cells incubated with biotin-conjugated cholera toxin. To prepare membrane sheets, pressure was applied to the grids for 20 s, then grids were lifted so that the fragments of the upper cell surface adhered to the grid. These membrane portions were fixed in 2% paraformaldehyde for 10 min at 4°C, immediately after cell stimulation and sheet preparation, which required <30 s. After blocking in PBS with 1% BSA and 1% acetylated BSA, the immune labeling was performed and revealed with 10 nm or 15 nm gold particle-conjugated secondary antibodies and 6-nm particle-conjugated streptavidin. These membrane portions were fixed in 2% glutaraldehyde in PBS, postfixed with 1% OsO<sub>4</sub>, dehydrated in a graded ethanol series, treated with hexamethyldisilazane (Sigma-Aldrich), air-dried, and studied using a transmission electron microscope (7500; Hitachi) equipped with camera (C4742-51-12NR; Hamamatsu Photonics).

Granules were counted on random TEM images of plasma membrane sheets (*n* = 25–50 images of 45 μm<sup>2</sup> of plasma membrane). The data are expressed as number of granules/μm<sup>2</sup>.

### Mapping gold particle distribution and analysis

To map gold particle distribution, images of labeled plasma membrane sheets were digitized, and the coordinates of all gold particles in a given area were determined using an ImageJ plug-in (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) as described previously (Zhang et al., 2006a,b). To define spatial relationships of two different sizes of gold beads, Ripley's univariate K-function analysis was used. Analysis of the coordinates indicates whether the gold pattern is clustered, dispersed, or random. Colocalization of the two proteins was determined by analyzing the extent to which the two populations of gold particles were clustered with respect to each other using an Excel macro written in Visual Basic, provided by J.F. Hancock (Department of Integrative Biology and Pharmacology, University of Texas Medical School, Houston, TX)(Rotblat et al., 2004; Hancock and Prior, 2005). A macro is available as supplement S1.

### Electron tomography and image processing

Tilt series were acquired on a transmission electron microscope (JEM-2100; JEOL) operated at 200 kV. Data were automatically acquired using digital micrograph software. Typically, the tilt ranged between –60 and +60 with 2° angular increments. Images were recorded mainly at a nominal magnification of 10,000 on an Ultrascan 2k × 2k CCD camera (Gatan) with defocus set to –4 μm. Alignments and weighted back-projection-based reconstructions of raw tilt series, using anti-actin immunogold particles as fiducial markers, were computed with the IMOD software package (Kremer et al., 1996). Three-dimensional reconstructions were visualized with UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004).

### Statistical analysis

As specified in the figure legends, group data are presented as mean (±SEM) or median, and were analyzed using a Mann-Whitney test. Asterisks in each box and whisker plot indicate statistical significance (\*, *P* < 0.05; \*\*, *P* < 0.01; \*\*\*, *P* < 0.001).

### Online supplemental material

Fig. S1 shows the distribution of GM1 and actin on plasma membrane sheets visualized by immunogold labeling and electron microscopy at a lower magnification (70,000×). Video 1 shows a 3D representation of the cortical actin network surrounding the secretory granule docked at the plasma membrane of a nicotine-stimulated chromaffin cell. Video 2

Table 1. Characteristics of amperometric spikes and PSFs in transfected chromaffin cells

Parameters analyzed	Control (NT)	A2 WT	A2 K286A	WA	A2 WT + WA	A2 K286A +WA
Number of cells	56	25	32	39	25	25
Number of spikes (total)	1,322	551	358	1,136	702	304
Number of spikes per cell	23 ± 1	22 ± 2	11 ± 1	29 ± 3	28 ± 3	12 ± 1
Number of spikes (analyzed)	1,021	499	275	933	638	217
<i>I</i> <sub>max</sub> (pA)	61.1 ± 2.9	61.2 ± 2.4	50.4 ± 1.9	79.6 ± 2.0	73.4 ± 3.1	52.2 ± 2.3
Half width (ms)	28.2 ± 4.2	30.1 ± 4.1	46.8 ± 2.9	21.6 ± 2.6	22.5 ± 3.3	47.8 ± 3.1
Q (fC)	1780 ± 170	1770 ± 80	1750 ± 120	1790 ± 90	1720 ± 120	1790 ± 50
Slope (pA/ms)	6.1 ± 0.9	5.8 ± 0.9	2.9 ± 0.8	10.9 ± 0.7	11.2 ± 1.5	3.1 ± 0.7
Rise time (ms)	10.2 ± 1.8	11.5 ± 1.5	18.1 ± 1.2	7.1 ± 1.1	7.1 ± 1.1	19.1 ± 2.1
Decay time (ms)	58.9 ± 5.9	60.9 ± 3.5	65.8 ± 2.2	35.7 ± 2.0	38.8 ± 3.2	64.1 ± 4.0
Spike with foot (%)	29	26	32	17	16	27
Number of feet analyzed	304	129	89	159	102	59
Number of feet per cell	5.4 ± 0.9	5.1 ± 0.9	2.7 ± 0.8	4.0 ± 0.4	4.0 ± 0.8	2.4 ± 0.7
<i>I</i> foot (pA)	4.4 ± 0.6	4.4 ± 0.8	4.5 ± 0.7	5.4 ± 0.7	4.9 ± 0.7	4.1 ± 0.5
Q foot (fC)	20.8 ± 2.1	20.8 ± 2.3	31.3 ± 3.4	15.3 ± 4.4	14.3 ± 3.4	30.6 ± 1.9
<i>t</i> foot(ms)	14.7 ± 2.1	15.7 ± 1.9	24.3 ± 2.1	9.3 ± 2.5	8.3 ± 2.1	23.5 ± 0.9

The expression of Anx2-K286A-GFP and WA treatment significantly affected various amperometric signal parameters when catecholamine release was evoked after the application of 100 mM KCl for 10 s.

shows a 3D representation of the cortical actin meshwork associated to the docked granules of a nicotine-stimulated chromaffin cell treated with WA. Supplement S1 contains Excel macro Bivariate\_Kv3.0, which was written in Visual Basic, provided by J.F. Hancock, and used to determine colocalization of the two proteins by analyzing the extent to which the two populations of gold particles were clustered with respect to each other. Online supplemental material is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201412030/DC1>.

## Acknowledgements

We thank Drs. N. Grant and S. Gasman for helpful comments and critical reading of the manuscript and T. Thahouly for technical assistance.

This work was supported by Agence Nationale de la Recherche grant ANR-09-BLAN-0326-01 (to N. Vitale).

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions: M.F. Bader and S. Chasserot-Golaz designed the study, project, and experiments. M. Gabel performed immunolabeling and transfection experiments. F. Delavoie performed and analyzed electron tomography. V. Demais, C. Royer, and Y. Bailly performed and analyzed electron microscopy. N. Vitale performed, analyzed, and discussed amperometry experiments. M.-F. Bader and S. Chasserot-Golaz drafted the manuscript.

Submitted: 5 December 2014

Accepted: 23 July 2015

## References

- Ammar, M.R., N. Kassas, S. Chasserot-Golaz, M.F. Bader, and N. Vitale. 2013. Lipids in regulated exocytosis: What are they doing? *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 4:125.
- Aoyagi, K., T. Sugaya, M. Umeda, S. Yamamoto, S. Terakawa, and M. Takahashi. 2005. The activation of exocytotic sites by the formation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate microdomains at syntaxin clusters. *J. Biol. Chem.* 280:17346–17352. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M413307200>
- Astro, V., and I. de Curtis. 2015. Plasma membrane-associated platforms: dynamic scaffolds that organize membrane-associated events. *Sci. Signal.* 8:re1. <http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.aaa3312>
- Bader, M.F., J.M. Trifaró, O.K. Langley, D. Thiersé, and D. Aunis. 1986. Secretory cell actin-binding proteins: identification of a gelsolin-like protein in chromaffin cells. *J. Cell Biol.* 102:636–646. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.102.2.636>
- Berberian, K., A.J. Torres, Q. Fang, K. Kisler, and M. Lindau. 2009. F-actin and myosin II accelerate catecholamine release from chromaffin granules. *J. Neurosci.* 29:863–870. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2818-08.2009>
- Bharadwaj, A., M. Bydoun, R. Holloway, and D. Waisman. 2013. Annexin A2 heterotetramer: structure and function. *Int. J. Mol. Sci.* 14:6259–6305. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms14036259>
- Chasserot-Golaz, S., N. Vitale, I. Sagot, B. Delouche, S. Dirrig, L.A. Pradel, J.P. Henry, D. Aunis, and M.F. Bader. 1996. Annexin II in exocytosis: catecholamine secretion requires the translocation of p36 to the subplasmalemmal region in chromaffin cells. *J. Cell Biol.* 133:1217–1236. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.133.6.1217>
- Chasserot-Golaz, S., N. Vitale, E. Umbrecht-Jenck, D. Knight, V. Gerke, and M.F. Bader. 2005. Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Mol. Biol. Cell.* 16:1108–1119. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E04-07-0627>
- Chasserot-Golaz, S., J.R. Coorsen, F.A. Meunier, and N. Vitale. 2010. Lipid dynamics in exocytosis. *Cell. Mol. Neurobiol.* 30:1335–1342. <http://dx.doi.org/10.1007/s10571-010-9577-x>
- Chiang, H.C., W. Shin, W.D. Zhao, E. Hamid, J. Sheng, M. Baydyuk, P.J. Wen, A. Jin, F. Mombouisse, and L.G. Wu. 2014. Post-fusion structural changes and their roles in exocytosis and endocytosis of dense-core vesicles. *Nat. Commun.* 5:3356. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms4356>
- Cookson, E.A., I.L. Conte, J. Dempster, M.J. Hannah, and T. Carter. 2013. Characterisation of Weibel-Palade body fusion by amperometry in endothelial cells reveals fusion pore dynamics and the effect of cholesterol on exocytosis. *J. Cell Sci.* 126:5490–5499. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.138438>
- Desnos, C., J.S. Schonn, S. Huet, V.S. Tran, A. El-Amraoui, G. Raposo, I. Fanget, C. Chapuis, G. Ménasché, G. de Saint Basile, et al. 2003. Rab27A and its effector MyRIP link secretory granules to F-actin and control their motion towards release sites. *J. Cell Biol.* 163:559–570. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200302157>
- Dinic, J., P. Ashrafzadeh, and I. Parmryd. 2013. Actin filaments attachment at the plasma membrane in live cells cause the formation of ordered lipid domains. *Biochim. Biophys. Acta.* 1828:1102–1111. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbame.2012.12.004>
- Donato, R. 2001. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33:637–668. [http://dx.doi.org/10.1016/S1357-2725\(01\)00046-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1357-2725(01)00046-2)
- Drücker, P., M. Pejic, H.J. Galla, and V. Gerke. 2013. Lipid segregation and membrane budding induced by the peripheral membrane binding protein annexin A2. *J. Biol. Chem.* 288:24764–24776. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.474023>
- Falsey, R.R., M.T. Marron, G.M. Gunaherath, N. Shirahatti, D. Mahadevan, A.A. Gunatilaka, and L. Whitesell. 2006. Actin microfilament aggregation induced by withaferin A is mediated by annexin II. *Nat. Chem. Biol.* 2:33–38. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio755>
- Gasman, S., S. Chasserot-Golaz, M. Malacombe, M. Way, and M.F. Bader. 2004. Regulated exocytosis in neuroendocrine cells: a role for subplasmalemmal Cdc42/N-WASP-induced actin filaments. *Mol. Biol. Cell.* 15:520–531. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E03-06-0402>
- Gerke, V., C.E. Creutz, and S.E. Moss. 2005. Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:449–461. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1661>
- Gokhale, N.A., A. Abraham, M.A. Digman, E. Gratton, and W. Cho. 2005. Phosphoinositide specificity of and mechanism of lipid domain formation by annexin A2-p11 heterotetramer. *J. Biol. Chem.* 280:42831–42840. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M508129200>
- Gutiérrez, L.M. 2012. New insights into the role of the cortical cytoskeleton in exocytosis from neuroendocrine cells. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* 295:109–137. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394306-4.00009-5>
- Hancock, J.F., and I.A. Prior. 2005. Electron microscopic imaging of Ras signaling domains. *Methods.* 37:165–172. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.05.018>
- Harder, T., P. Scheiffele, P. Verkade, and K. Simons. 1998. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J. Cell Biol.* 141:929–942. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.141.4.929>
- Hayes, M.J., D. Shao, M. Bailly, and S.E. Moss. 2006. Regulation of actin dynamics by annexin 2. *EMBO J.* 25:1816–1826. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601078>
- Hitchcock, J.K., A.A. Katz, and G. Schäfer. 2014. Dynamic reciprocity: the role of annexin A2 in tissue integrity. *J. Cell Commun. Signal.* 8:125–133. <http://dx.doi.org/10.1007/s12079-014-0231-0>
- Ikebuchi, N.W., and D.M. Waisman. 1990. Calcium-dependent regulation of actin filament bundling by lipocortin-85. *J. Biol. Chem.* 265:3392–3400.
- Jahn, R., and D. Fasshauer. 2012. Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature.* 490:201–207. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11320>
- Janes, P.W., S.C. Ley, and A.I. Magee. 1999. Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J. Cell Biol.* 147:447–461. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.147.2.447>
- Jones, P.G., G.J. Moore, and D.M. Waisman. 1992. A nonapeptide to the putative F-actin binding site of annexin-II tetramer inhibits its calcium-dependent activation of actin filament bundling. *J. Biol. Chem.* 267:13993–13997.
- Kremer, J.R., D.N. Mastronarde, and J.R. McIntosh. 1996. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J. Struct. Biol.* 116:71–76. <http://dx.doi.org/10.1006/jjsbi.1996.0013>
- Lang, T. 2007. SNARE proteins and 'membrane rafts'. *J. Physiol.* 585:693–698. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2007.134346>
- Lewit-Bentley, A., S. Réty, J. Sopkova-de Oliveira Santos, and V. Gerke. 2000. S100-annexin complexes: some insights from structural studies. *Cell Biol. Int.* 24:799–802. <http://dx.doi.org/10.1006/cbir.2000.0629>
- Malacombe, M., M.F. Bader, and S. Gasman. 2006. Exocytosis in neuroendocrine cells: new tasks for actin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1763:1175–1183. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.09.004>

- Miklavc, P., E. Hecht, N. Hobi, O.H. Wittekindt, P. Dietl, C. Kranz, and M. Frick. 2012. Actin coating and compression of fused secretory vesicles are essential for surfactant secretion—a role for Rho, formins and myosin II. *J. Cell Sci.* 125:2765–2774. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.105262>
- Monck, J.R., A.F. Oberhauser, G. Alvarez de Toledo, and J.M. Fernandez. 1991. Is swelling of the secretory granule matrix the force that dilates the exocytotic fusion pore? *Biophys. J.* 59:39–47. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(91\)82196-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82196-8)
- Nakata, T., K. Sobue, and N. Hirokawa. 1990. Conformational change and localization of calpactin I complex involved in exocytosis as revealed by quick-freeze, deep-etch electron microscopy and immunocytochemistry. *J. Cell Biol.* 110:13–25. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.110.1.13>
- Ozorowski, G., C.M. Ryan, J.P. Whitelegge, and H. Luecke. 2012. Withaferin A binds covalently to the N-terminal domain of annexin A2. *Biol. Chem.* 393:1151–1163. <http://dx.doi.org/10.1515/hsz-2012-0184>
- Papadopoulos, A., S. Martin, V.M. Tomatis, R.S. Gormal, and F.A. Meunier. 2013a. Secretagogue stimulation of neurosecretory cells elicits filopodial extensions uncovering new functional release sites. *J. Neurosci.* 33:19143–19153. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2634-13.2013>
- Papadopoulos, A., V.M. Tomatis, R. Kasula, and F.A. Meunier. 2013b. The cortical actin-myosin network: from diffusion barrier to functional gateway in the transport of neurosecretory vesicles to the plasma membrane. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 4:153.
- Petersen, E.F., T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, and T.E. Ferrin. 2004. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25:1605–1612. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Poëa-Guyon, S., M.R. Ammar, M. Erard, M. Amar, A.W. Moreau, P. Fossier, V. Gleize, N. Vitale, and N. Morel. 2013. The V-ATPase membrane domain is a sensor of granular pH that controls the exocytotic machinery. *J. Cell Biol.* 203:283–298. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201303104>
- Rescher, U., N. Zobiack, and V. Gerke. 2000. Intact Ca<sup>2+</sup>-binding sites are required for targeting of annexin 1 to endosomal membranes in living HeLa cells. *J. Cell Sci.* 113:3931–3938.
- Rescher, U., C. Ludwig, V. Konietzko, A. Kharitonov, and V. Gerke. 2008. Tyrosine phosphorylation of annexin A2 regulates Rho-mediated actin rearrangement and cell adhesion. *J. Cell Sci.* 121:2177–2185. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.028415>
- Rotblat, B., I.A. Prior, C. Muncke, R.G. Parton, Y. Kloog, Y.I. Henis, and J.F. Hancock. 2004. Three separable domains regulate GTP-dependent association of H-ras with the plasma membrane. *Mol. Cell Biol.* 24:6799–6810. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.24.15.6799-6810.2004>
- Saka, S.K., A. Honigsmann, C. Eggeling, S.W. Hell, T. Lang, and S.O. Rizzoli. 2014. Multi-protein assemblies underlie the mesoscale organization of the plasma membrane. *Nat. Commun.* 5:4509. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms5509>
- Sankaranarayanan, S., P.P. Atluri, and T.A. Ryan. 2003. Actin has a molecular scaffolding, not propulsive, role in presynaptic function. *Nat. Neurosci.* 6:127–135. <http://dx.doi.org/10.1038/nn1002>
- Sebastião, A.M., M. Colino-Oliveira, N. Assaife-Lopes, R.B. Dias, and J.A. Ribeiro. 2013. Lipid rafts, synaptic transmission and plasticity: impact in age-related neurodegenerative diseases. *Neuropharmacology*. 64:97–107. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.06.053>
- Segura, F., M.A. Brioso, J.F. Gómez, J.D. Machado, and R. Borges. 2000. Automatic analysis for amperometrical recordings of exocytosis. *J. Neurosci. Methods*. 103:151–156. [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-0270\(00\)00309-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-0270(00)00309-5)
- Sontag, J.M., D. Aunis, and M.F. Bader. 1988. Peripheral actin filaments control calcium-mediated catecholamine release from streptolysin-O-permeabilized chromaffin cells. *Eur. J. Cell Biol.* 46:316–326.
- Tomatis, V.M., A. Papadopoulos, N.T. Malintan, S. Martin, T. Wallis, R.S. Gormal, J. Kendrick-Jones, F. Buss, and F.A. Meunier. 2013. Myosin VI small insert isoform maintains exocytosis by tethering secretory granules to the cortical actin. *J. Cell Biol.* 200:301–320. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201204092>
- Toonen, R.F., O. Kochubey, H. de Wit, A. Gulyas-Kovacs, B. Konijnenburg, J.B. Sørensen, J. Klingauf, and M. Verhage. 2006. Dissecting docking and tethering of secretory vesicles at the target membrane. *EMBO J.* 25:3725–3737. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601256>
- Torregrosa-Hetland, C.J., J. Villanueva, V. Garcia-Martínez, G. Expósito-Romero, M.M. Francés, and L.M. Gutiérrez. 2013. Cortical F-actin affects the localization and dynamics of SNAP-25 membrane clusters in chromaffin cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45:583–592. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2012.11.021>
- Umbrecht-Jenck, E., V. Demais, V. Calco, Y. Bailly, M.F. Bader, and S. Chasserot-Golaz. 2010. S100A10-mediated translocation of annexin-A2 to SNARE proteins in adrenergic chromaffin cells undergoing exocytosis. *Traffic*. 11:958–971. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01065.x>
- Vitale, N., J. Moss, and M. Vaughan. 1996. ARD1, a 64-kDa bifunctional protein containing an 18-kDa GTP-binding ADP-ribosylation factor domain and a 46-kDa GTPase-activating domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:1941–1944. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.93.5.1941>
- Wilson, B.S., S.L. Steinberg, K. Liederman, J.R. Pfeiffer, Z. Surviladze, J. Zhang, L.E. Samelson, L.H. Yang, P.G. Kotula, and J.M. Oliver. 2004. Markers for detergent-resistant lipid rafts occupy distinct and dynamic domains in native membranes. *Mol. Biol. Cell*. 15:2580–2592. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E03-08-0574>
- Zhang, J., K. Liederman, J.R. Pfeiffer, B.S. Wilson, J.M. Oliver, and S.L. Steinberg. 2006a. Characterizing the topography of membrane receptors and signaling molecules from spatial patterns obtained using nanometer-scale electron-dense probes and electron microscopy. *Micron*. 37:14–34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2005.03.014>
- Zhang, Z., A.K. Ottens, S.F. Larner, F.H. Kobeissy, M.L. Williams, R.L. Hayes, and K.K. Wang. 2006b. Direct Rho-associated kinase inhibition [correction of inhibitor] induces cofilin dephosphorylation and neurite outgrowth in PC-12 cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 11:12–29. <http://dx.doi.org/10.2478/s11658-006-0002-x>
- Zobiack, N., V. Gerke, and U. Rescher. 2001. Complex formation and submembranous localization of annexin 2 and S100A10 in live HepG2 cells. *FEBS Lett.* 500:137–140. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02604-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02604-7)

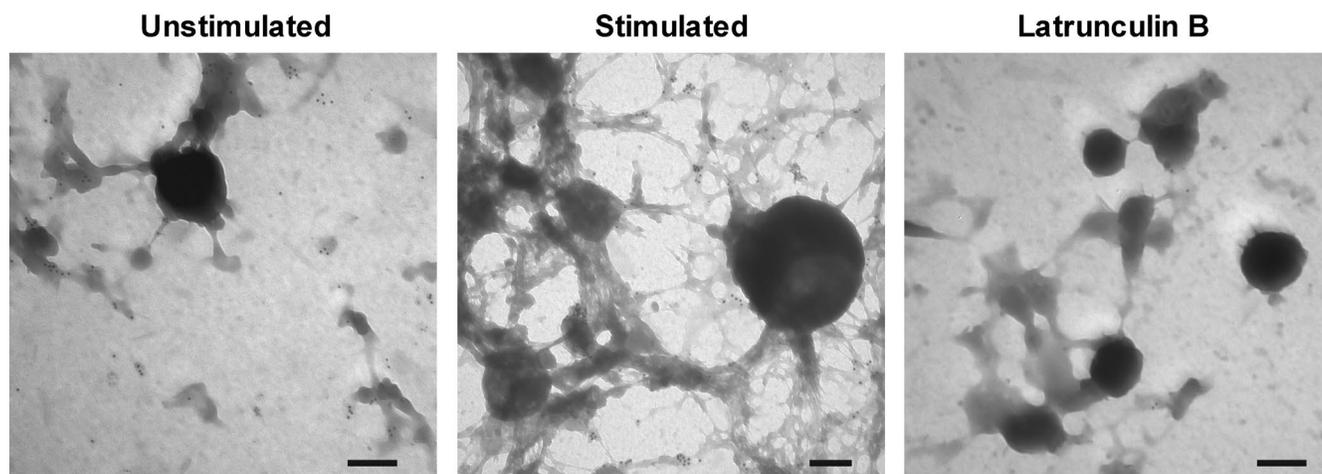
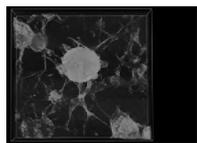
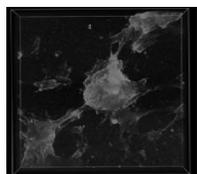
Gabel et al., <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201412030/DC1>

Figure S1. **Distribution of GM1 and actin on plasma membrane sheets visualized by immunogold labeling and electron microscopy at lower magnification (70,000 $\times$ ).** Membrane sheets were prepared from untreated cells or cells stimulated with 20  $\mu$ M nicotine in the presence of biotinylated cholera toxin to detect external GM1. Cells were treated with 50  $\mu$ M latrunculin B when indicated. Membranes were then incubated with anti-actin antibodies revealed with rabbit antibodies coupled to 10 nm gold particles and streptavidin coupled to 6 nm gold particles to reveal cholera toxin/GM1. Bars, 200 nm.

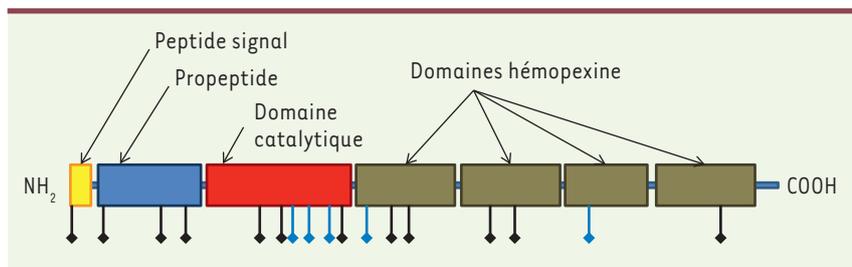


Video 1. **Cortical actin network surrounding the secretory granule docked at the plasma membrane of a nicotine-stimulated chromaffin cell.** This 3D representation of docked granule presented in Fig. 2 was obtained from electron tomography acquisition of cytoplasmic face-up membrane sheets of stimulated cell, and shows an organized meshwork of actin filaments connecting the docked granule to the plasma membrane.



Video 2. **Disorganization and thickening of the cortical actin meshwork associated to the docked granule of a WA-treated cell.** This 3D representation of docked granules presented in Fig. 6, obtained from electron tomography image analysis of a nicotine-stimulated chromaffin cell after WA treatment, shows an increase in thickness of the actin coat and bundles connecting secretory granules to the plasma membrane.

# Publication 2



**Figure 2.** Schéma indiquant les différents domaines de la métalloprotéase MMP21. L'emplacement des mutations est symbolisé en-dessous de la protéine, avec en noir les mutations de l'article de Guimier *et al.* [5], et en bleu les mutations rapportées dans deux autres articles [6, 7].

### Conclusion

Cette étude a mis en évidence pour la première fois le rôle d'une métalloprotéase dans la latéralisation de la plupart des vertébrés. Le substrat de cette métalloprotéase est à ce jour inconnu. La prévalence élevée (5,9 %) de mutations de *MMP21* dans notre groupe de patients atteints d'hétérotaxie avec ou sans malformation cardiaque place ce gène en première position des gènes responsables d'hétérotaxie devant le gène *ZIC3* (*zic family member 3*, environ

3 % des cas). La pénétrance, quoique incomplète, est très élevée (environ 90 % dans notre groupe de patients) et donc bien supérieure à la pénétrance de l'hétérotaxie lorsqu'un gène codant une protéine du cil embryonnaire est impliqué (pénétrance de 50 %). ♦

**A gene coding for a metalloprotease for the first time implied in heterotaxy**

### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

### RÉFÉRENCES

- Bajolle F, Zaffran S. Le débit cardiaque, acteur majeur de la morphogénèse asymétrique des arcs aortiques. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 354-6.
- Diguet N, Meilhac SM. Cils et morphogénèse cardiaque. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 996-1003.
- Bachmann-Gagescu R. Complexité génétique des ciliopathies et identification de nouveaux gènes. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 1011-23.
- Liu H, Jimenez G, El Malti R, *et al.* Défauts de latéralisation et hétérotaxie. *EMC-Cardiologie* 2014 ; 9 : 1-14.
- Guimier A, Gabriel GC, Bajolle F, *et al.* MMP21 is mutated in human heterotaxy and is required for normal left-right asymmetry in vertebrates. *Nat Genet* 2015 ; 47 : 1260-3.
- Akawi N, McRae J, Ansari M, *et al.* Discovery of four recessive developmental disorders using probabilistic genotype and phenotype matching among 4,125 families. *Nat Genet* 2015 ; 47 : 1363-9.
- Perles Z, Moon S, Ta-Shma A, *et al.* A human laterality disorder caused by a homozygous deleterious mutation in MMP21. *J Med Genet* 2015 ; 52 : 840-7.
- Ahokas K, Lohi J, Lohi H, *et al.* Matrix metalloproteinase-21, the human orthologue for XMMP, is expressed during fetal development and in cancer. *Gene* 2002 ; 301 : 31-41.
- Li Y, Klena NT, Gabriel GC, *et al.* Global genetic analysis in mice unveils central role for cilia in congenital heart disease. *Nature* 2015 ; 521 : 520-4.
- Tremblay JP. CRISPR, un système qui permet de corriger ou de modifier l'expression de gènes responsables de maladies héréditaires. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 1014-22.

### NOUVELLE

## Actine et annexine A2

### Partenaires essentiels pour le contrôle de la sécrétion neuroendocrine

Marion Gabel<sup>1</sup>, Franck Delavoie<sup>2</sup>, Nicolas Vitale<sup>1</sup>, Marie-France Bader<sup>1</sup>, Sylvette Chasserot-Golaz<sup>1</sup>

Le fonctionnement des systèmes nerveux et neuroendocrine repose sur une communication cellulaire élaborée soutenue par un trafic membranaire intense. Les molécules impliquées dans cette communication sont stockées dans des granules de sécrétion et libérées dans le milieu extracellulaire par fusion des granules avec la membrane plasmique, un processus appelé exocytose régulée [1]. Dans les cellules neuroendocrines, l'arrimage des granules de sécrétion à la membrane plasmique,

puis leur fusion, se font au niveau de sites membranaires dont l'architecture est portée par des lipides spécifiques. Ces domaines lipidiques, aussi appelés radeaux lipidiques, correspondent aux sites d'exocytose de la membrane plasmique et peuvent se former de façon transitoire selon l'état d'activation des cellules [2]. Ils recrutent, activent ou séparent les acteurs de l'exocytose comme les protéines du complexe SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*),

<sup>1</sup> Institut des neurosciences cellulaires et intégratives, CNRS - UPR 3212 et université de Strasbourg, 5, rue Blaise Pascal, F-67084, Strasbourg, France.

<sup>2</sup> Laboratoire de biologie moléculaire eucaryote, UMR5099 CNRS-université de Toulouse III Paul Sabatier, 118, route de Narbonne, F-31000, Toulouse, France.

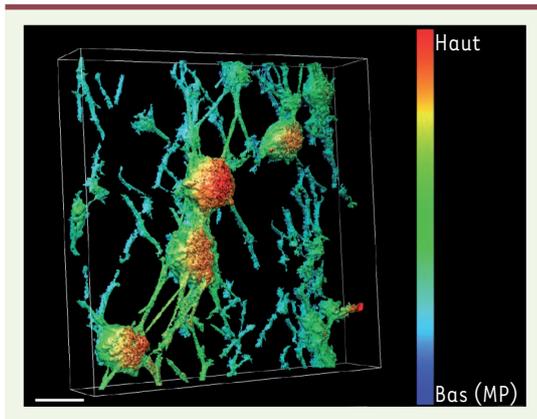
chasserot@inci-cnrs.unistra.fr

nécessaires à l'arrimage et à la fusion des granules à la membrane plasmique [3, 4] (→).

L'annexine A2 a été l'une des premières protéines identifiées au niveau des sites d'exocytose [5]. Elle fait partie

(→) Voir la Synthèse de T. Galli *et al.*, *m/s* n° 11, novembre 2002, page 1113 et la Nouvelle de O. El Far et M. Seagar, *m/s* n° 1, janvier 2011, page 28

de la famille des annexines, protéines capables de s'associer aux membranes biologiques en présence de calcium. Une des particularités de l'annexine A2



**Figure 1. Organisation du cytosquelette d'actine au niveau des sites d'exocytose dans une cellule chromaffine.** Représentation en trois dimensions obtenue par tomographie électronique de granules de sécrétion ancrés à la membrane plasmique dans une cellule chromaffine stimulée par un sécrétagogue. L'échelle de fausses couleurs correspond aux différents plans tomographiques, le plan le plus

bas représente la membrane plasmique (MP en bleu). Barre : 100 nm.

est sa capacité à lier simultanément les phospholipides et le cytosquelette d'actine [6], deux acteurs majeurs de l'exocytose. Bien que de nombreuses études aient suggéré un rôle important de l'annexine A2 au cours de l'exocytose, sa fonction précise est restée longtemps énigmatique. Dans des cellules chromaffines<sup>1</sup>, modèle classiquement utilisé pour étudier les modalités moléculaires de la sécrétion neuroendocrine, nous avons montré que l'annexine A2 est à l'origine de domaines lipidiques, riches en ganglioside<sup>2</sup> GM1 et en phosphoinositides, nécessaires à l'exocytose [7, 8]. Nos travaux récents révèlent comment l'annexine A2, en établissant un étroit partenariat avec le cytosquelette d'actine, forme des plateformes lipidiques dont le rôle est le recrutement spatio-temporel des différents acteurs de l'exocytose [9].

### Un nouveau rôle pour le cytosquelette d'actine au cours de la sécrétion neuroendocrine

Le cytosquelette d'actine est un acteur majeur de la sécrétion neuroendocrine. Dans les cellules au repos, l'actine forme un réseau dense de filaments, sous la membrane plasmique, qui

constitue une barrière physique dont la fonction classique est d'empêcher le recrutement inopiné des granules à la membrane plasmique. Différentes études fonctionnelles, basées sur la détection de filaments d'actine au niveau des sites d'exocytose dans les cellules chromaffines, suggèrent que l'exocytose nécessite aussi une intervention active de l'actine [10]. Nous avons récemment mis au point une technique permettant d'observer au microscope électronique la face cytoplasmique de la membrane plasmique d'une cellule chromaffine en cours d'exocytose. Les images en trois dimensions de ces feuilletts membranaires révèlent des granules de sécrétion arrimés à la membrane plasmique par des câbles d'actine au niveau de domaines lipidiques enrichis en ganglioside GM1 (Figure 1). Ces images inédites nous ont permis d'observer pour la première fois l'organisation de l'actine au voisinage des sites d'exocytose. Différentes structures apparaissent : des filaments d'actine parallèles à la membrane plasmique (Figure 1, en bleu) dont le rôle pourrait être de former et/ou de stabiliser la plateforme lipidique ; des filaments de type cordons, plus épais, semblant ancrer le granule à la membrane plasmique (Figure 1, en vert) ; et finalement un manteau d'actine recouvrant partiellement la surface du granule (Figure 1, en rouge). Ces structures d'actine semblent constituer

un réseau dynamique autour du granule de sécrétion pour permettre le bon déroulement des différentes étapes de l'exocytose [11]. De fait, la possibilité de mesurer la sécrétion à l'échelle d'un granule par la technique d'ampérométrie<sup>3</sup>, nous a permis d'obtenir des données fonctionnelles indiquant la participation de l'actine, non seulement au recrutement et à la fusion des granules de sécrétion à la membrane plasmique, mais aussi directement à la libération du contenu granulaire, vraisemblablement en compressant, telle une éponge, les granules ancrés à la membrane.

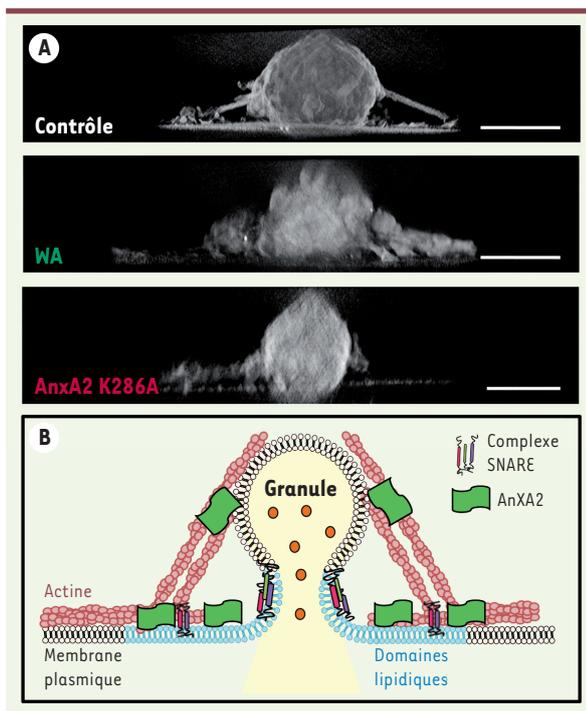
### L'annexine A2, protéine-clé pour une mise en place des sites d'exocytose

L'annexine A2 est capable, en présence de calcium, d'assembler plusieurs filaments d'actine pour en faire des câbles et des faisceaux. Nous avons donc étudié si cette propriété de fasciculation de l'actine pouvait être en lien avec la formation des plateformes lipidiques nécessaires à la sécrétion. Deux approches complémentaires ont été choisies pour tenter de répondre à cette question : d'une part, une approche pharmacologique utilisant la withaférine A, une lactone extraite de *Withania somnifera*, généralement utilisée dans le traitement de certains cancers et des troubles neurologiques, et qui stimule l'activité de fasciculation de l'actine de l'annexine A2 ; et d'autre part, une approche génétique basée sur l'expression d'un mutant de l'annexine A2 (AnxA2K286A) incapable de former des faisceaux d'actine. L'observation de feuilletts membranaires de cellules chromaffines, exposées à la withaférine A ou exprimant le mutant AnxA2K286A de l'annexine A2, montre que le réseau

<sup>1</sup> Les cellules chromaffines sont des cellules neuroendocrines présentes dans les glandes médullosurrénales et dans les ganglions du système nerveux sympathique. Elles tirent leur nom de la coloration qu'elles prennent en présence de sels de chrome.

<sup>2</sup> Lipides de la famille des glycosphingolipides.

<sup>3</sup> Méthode électrochimique permettant d'enregistrer les événements d'exocytose sur cellule unique. Une électrode en fibre de carbone, maintenue à un potentiel imposé de 800 mV permettant l'oxydation des catécholamines, est appliquée sur la surface de la cellule pour mesurer le courant électrique produit par l'oxydation des catécholamines libérées dans le milieu [12].



**Figure 2. Formation de faisceaux d'actine par l'annexine A2 au cours de l'exocytose.** **A.** Granules de sécrétion arrimés à la membrane plasmique stimulée (contrôle), traitée à la Withaférine A (WA) ou exprimant le mutant de l'annexine A2 (AnxA2 K286A). Vues de profil obtenues par tomographie électronique. Barre : 200 nm. **B.** Représentation schématique du mode d'action de l'annexine A2 au cours de l'exocytose.

d'actine au niveau des sites d'exocytose est altéré (Figure 2A). La stimulation de l'activité de fasciculation de l'annexine A2 par la withaférine A épaissit les faisceaux d'actine entourant les granules arrimés à la membrane plasmique. À l'inverse, l'expression du mutant d'annexine A2 dépourvu d'activité de fasciculation produit une désorganisation de l'actine et une disparition des filaments d'ancrage des granules de sécrétion à la membrane plasmique. En parallèle, la formation des domaines lipidiques et l'activité d'exocytose sont modifiées. Une stimulation de la fasciculation de l'actine par l'annexine A2 conduit à une augmentation du nombre de domaines lipidiques et de granules ancrés à la membrane plasmique, et à une accélération de l'étape de fusion. À l'inverse, l'incapacité de l'annexine A2 à former des faisceaux d'actine se traduit par une réduction de la formation de domaines lipidiques et du nombre d'événements d'exocytose. L'activité de fasciculation de l'actine par l'annexine A2 joue ainsi un rôle déterminant dans la mise en place des plateformes lipidiques et la cinétique des étapes de l'exocytose [11].

### Conclusions et perspectives

Cette première description tridimensionnelle des faisceaux d'actine formés par l'annexine A2 au niveau des sites d'exocytose représente une avancée majeure dans la compréhension des étapes ultimes de la sécrétion neuroendocrine. La formation de faisceaux d'actine par l'annexine A2, en limitant possiblement la mobilité et la diffusion latérale dans la membrane plasmique, joue ainsi un rôle essentiel dans la formation des domaines lipidiques, l'assemblage et/ou la maturation des sites d'exocytose (modèle présenté en Figure 2B). Cette fonction confère à l'annexine A2 un rôle pivot de régulateur de l'activité sécrétrice et de la libération hormonale.

Élucider le rôle de l'annexine A2 dans les circuits de l'exocytose complète nos connaissances des mécanismes de la sécrétion neuroendocrine et de la neurotransmission, et, plus généralement, permet de comprendre les mécanismes de formation et de régulation des domaines lipidiques dans les membranes biologiques. Il est évident que ces mécanismes sont directement couplés au contrôle spatial et temporel de la

transduction du signal. La compréhension de la genèse de ces domaines lipidiques au niveau moléculaire représente une avancée majeure en neurobiologie, particulièrement pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de traiter certaines neuropathologies [13]. ♦

### Actin and annexin A2: essential partners for the control of neuroendocrine secretion

#### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

1. Jahn R, Fasshauer D. Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature* 2012 ; 490 : 201-7.
2. Chamberlain LH, Burgoyne RD, Gould GW. SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 5619-24.
3. Galli T, Martinez-Arcal S, Paumet F. Mécanisme de la fusion membranaire. *Med Sci (Paris)* 2002 ; 18 : 1113-9.
4. El Far O, Seagar M. SNARE, V-ATPase et neurotransmission. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 28-31.
5. Nakata T, Sobue K, Hirokawa N. Conformational change and localization of calpactin I complex involved in exocytosis as revealed by quick-freeze, deep-etch electron microscopy and immunocytochemistry. *J Cell Biol* 1990 ; 110 : 13-25.
6. Bharadwaj A, Bydoun M, Holloway R, Waisman D. Annexin A2 heterotetramer: structure and function. *Int J Mol Sci* 2013 ; 14 : 6259-305.
7. Chasserot-Golaz S, Vitale N, Umbrecht-Jenck E, et al. Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Mol Biol Cell* 2005 ; 16 : 1108-19.
8. Umbrecht-Jenck E, Demais V, Calco V, et al. S100A10-mediated translocation of annexin-A2 to SNARE proteins in adrenergic chromaffin cells undergoing exocytosis. *Traffic* 2010 ; 11 : 958-71.
9. Menke M, Gerke V, Steinem C. Phosphatidylserine membrane domain clustering induced by annexin A2/S100A10 heterotetramer. *Biochemistry* 2005 ; 44 : 15296-303.
10. Gutierrez LM. New insights into the role of the cortical cytoskeleton in exocytosis from neuroendocrine cells. *Int Rev Cell Mol Biol* 2012 ; 295 : 109-37.
11. Gabel M, Delavoie F, Demais V, et al. Annexin A2-dependent actin bundling promotes secretory granule docking to the plasma membrane and exocytosis. *J Cell Biol* 2015 ; 210 : 785-800.
12. Mosharov EV, Sulzer D. Analysis of exocytotic events recorded by amperometry. *Nat Methods* 2005 ; 2 : 651-8.
13. Schengrund CL. Lipid rafts: keys to neurodegeneration. *Brain Res Bull* 2010 ; 82 : 7-17.

## 4) Discussion

L'annexine A2 est impliquée dans de nombreux processus membranaires, notamment au cours de la sécrétion neuroendocrine (Bharadwaj et al., 2013, Gabel et al., 2015). Dans les cellules chromaffines, lors du processus d'exocytose, l'annexine A2 transloque à la membrane plasmique, à proximité des complexes SNARE, où elle modifie la structure de la membrane en formant des microdomaines lipidiques enrichis en cholestérol, PIP<sub>2</sub> et en GM1 (Umbrecht-Jenck et al., 2010). Nous avons mis en évidence que la fasciculation des filaments d'actine par l'annexine A2 est nécessaire à la formation des domaines lipidiques mais également au recrutement des granules de sécrétion à la membrane plasmique ainsi qu'à leur fusion. Nos résultats mettent également en avant un nouveau rôle pour le cytosquelette d'actine au cours de la sécrétion neuroendocrine (Gabel et al., 2015). L'importance de ces travaux a été soulignée par le CNRS et la Société de Neuroendocrinologie (**Annexes 2-4**).

### a) Organisation tridimensionnelle de l'actine au niveau des sites d'exocytose

L'architecture des filaments d'actine au niveau du site d'exocytose a été visualisée en trois dimensions par tomographie électronique sur des feuillettes de membranes plasmiques de cellules chromaffines stimulées. Cette étude a montré que les granules de sécrétion sont "emprisonnés" dans un réseau d'actine qui les maintient à la membrane plasmique. On distingue trois structures différentes d'actine : un réseau d'actine subplasmalemmal, des torons d'actine plus épais qui relient le granule à la membrane, ainsi que des filaments qui forment un manteau à la surface du granule. Ces observations suggèrent donc, trois rôles différents du cytosquelette d'actine au cours du processus de sécrétion. Le réseau d'actine subplasmalemmal pourrait stabiliser les domaines lipidiques à la membrane plasmique pour former des pré-sites d'exocytose. Les câbles d'actine pourraient eux, constituer des points d'ancrage du granule sécrétion à la membrane plasmique, qui permettrait de le stabiliser après la formation des complexes SNARE. Le manteau d'actine pourrait, quant à lui, avoir un rôle au cours de la fusion, en exerçant des forces sur le granule, pour permettre l'expulsion de son contenu. De plus, lorsque l'activité de fasciculation des filaments d'actine de l'annexine A2 est augmentée ou diminuée, ces différentes structures d'actine sont modifiées. Ces résultats montrent pour la première fois un lien direct entre l'organisation du

cytosquelette d'actine au niveau du granule arrimé et, l'activité de fasciculation de l'annexine A2 au cours de l'exocytose dans les cellules chromaffines.

L'origine des filaments d'actine formés par l'annexine A2 reste encore à définir. Deux origines sont possibles : ce sont soit des filaments d'actine résiduels de la barrière corticale, soit des filaments néoformés. L'annexine A2 et son partenaire S100A10 étant capables de polymériser l'actine (Merrifield et al., 2001, Hayes et al., 2006), ils pourraient être à l'origine de ces filaments associés aux granules arrimés, *via* le recrutement de protéines impliquées dans la nucléation de nouveaux filaments d'actine comme Spire1 (Morel et al., 2009). Une autre hypothèse pourrait être l'intervention des cascades N-WASP/Cdc42/Arp2/3 (Gasman et al., 2004), Rab27A/MyRIP/myosine Va (Desnos et al., 2003) ou encore Rho/ROCK (Rescher et al., 2008) qui interviennent dans la synthèse et l'organisation du cytosquelette d'actine. Ces différentes hypothèses pourront être testées en étudiant l'expression de mutants dominants négatifs de Cdc42, Rab27A ou Rho dans les cellules chromaffines.

#### **b) La fasciculation de filaments d'actine par l'annexine A2 est nécessaire à la formation des microdomaines lipidiques**

Le regroupement et la formation de domaines lipidiques au sein de la membrane plasmique nécessitent l'intervention d'acteurs protéiques pour limiter et restreindre la diffusion des lipides. L'annexine A2 a la capacité d'agréger les lipides (Drucker et al., 2013) et sa translocation à la membrane plasmique, au niveau des protéines SNARE, est nécessaire à la formation des microdomaines lipidiques enrichis en GM1 et en PIP<sub>2</sub> (Chasserot-Golaz et al., 2005, Umbrecht-Jenck et al., 2010). L'utilisation de la latrunculine B, une drogue capable de dépolymériser les filaments d'actine, a mis en évidence que le cytosquelette d'actine est impliqué dans la formation des microdomaines lipidiques. De plus, nos résultats montrent que c'est la fasciculation par l'annexine A2 de filaments d'actine associés aux granules qui induit la formation de microdomaines lipidiques riches en GM1 à la membrane plasmique. En effet, si l'activité de fasciculation de l'annexine A2 est augmentée, il y a plus de domaines formés et plus de granules arrimés qui fusionnent avec la membrane plasmique. L'effet inverse est observé quand l'activité de fasciculation est inhibée. L'annexine A2 participe donc à l'organisation spatiale de la membrane plasmique et forme, à l'aide de l'actine, des domaines lipidiques nécessaires au bon fonctionnement des protéines SNARE. La présence

de ces domaines étant nécessaire au recrutement des granules de sécrétion, ils pourraient constituer de véritables pré-sites d'exocytose au sein de la membrane plasmique. En effet, la création d'un environnement lipidique propice à la formation des complexes SNARE pourrait promouvoir l'arrimage des granules de sécrétion à la membrane plasmique. Cependant, il n'est pas exclu que leur rôle soit, en plus, de stabiliser les granules arrimés *via* les complexes SNARE et les filaments d'actine, afin qu'ils ne se détachent pas (Toonen et al., 2006a).

### **c) La fasciculation de filaments d'actine par l'annexine A2 influence la cinétique de libération des catécholamines**

Finalement, nos expériences d'ampérométrie ont montrées que la fasciculation des filaments d'actine par l'annexine A2 influence également la cinétique de fusion des événements d'exocytose. En effet, lorsque l'activité de fasciculation de l'annexine A2 est augmentée, la cinétique de fusion des granules est accélérée et plus de catécholamines sont libérées, alors que l'effet inverse est observé lorsque l'activité de fasciculation est inhibée. Le flux de catécholamines libéré par un granule de sécrétion est donc corrélé à l'activité de fasciculation des filaments d'actine par l'annexine A2. L'expulsion du contenu granulaire pourrait être favorisée par les forces exercées par les câbles et le manteau d'actine. Il est intéressant de noter que lors de la contraction musculaire dans les cellules de muscles lisses, l'annexine A2 forme des complexes entre les lipides et le cytosquelette d'actine pour augmenter les forces exercées sur la membrane (Babiychuk et al., 1999). Une autre possibilité est que, dans les cellules chromaffines, la fasciculation de filaments d'actine par l'annexine A2 à proximité du granule de sécrétion ancré à la membrane plasmique, induise une déformation membranaire, initiant le processus de fusion.

L'annexine A2 pourrait également réguler la formation du pore de fusion *via* son activité de ségrégation des lipides (Drucker et al., 2013). En effet, le regroupement de certains lipides au sein des domaines lipidiques peut moduler la courbure et la tension membranaire et ainsi agir sur le processus de fusion (Salaun et al., 2004). L'agrégation de molécules de PIP<sub>2</sub> et de PA au niveau des microdomaines lipidiques pourrait ainsi impacter la courbure membranaire et favoriser la fusion des membranes granulaire et plasmique.

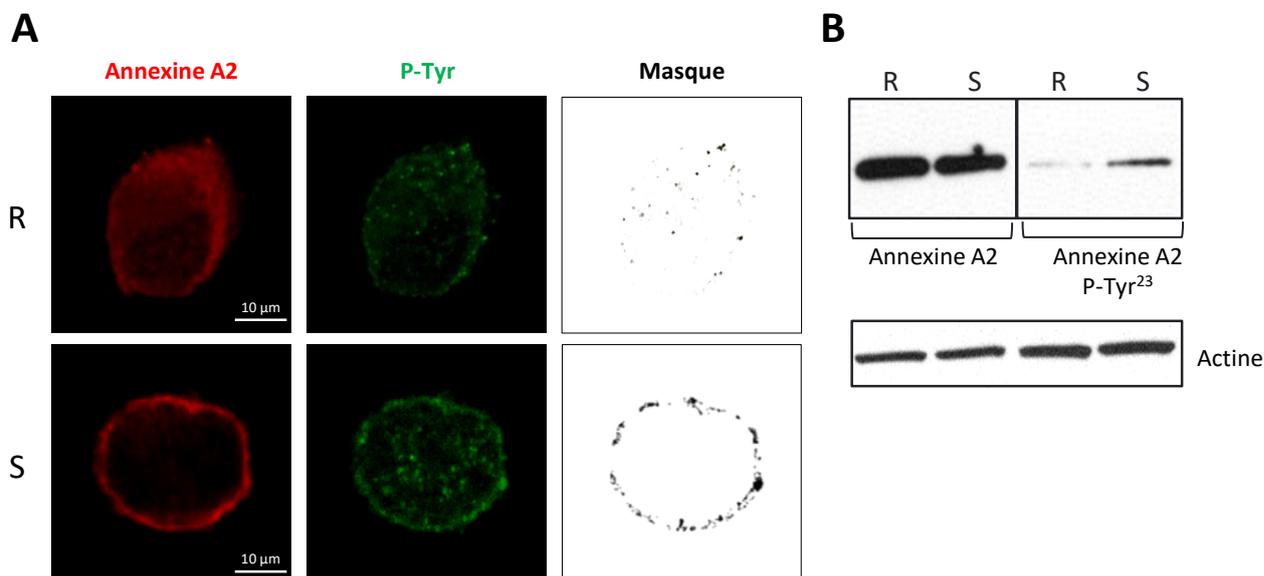
Au cours du processus d'exocytose, que ce soit à l'étape de recrutement des granules de sécrétion à la membrane plasmique ou lors de la fusion, l'annexine A2 pourrait agir indirectement *via* le cytosquelette d'actine et directement sur les lipides. La synchronisation de ces différentes actions nécessiterait alors une régulation très fine qui pourrait impliquer des cycles de phosphorylations/déphosphorylations.

## B. Régulation de l'annexine A2 par phosphorylation sur la Tyr<sup>23</sup> au cours de l'exocytose

### 1) Introduction

Après avoir montré l'implication de l'annexine A2 dans la formation des microdomaines lipidiques, une question importante restait encore sans réponse : comment l'annexine A2 est-elle régulée au cours de ce processus ?

Le domaine N-terminal de l'annexine A2 possède de nombreux sites de régulation (**Figure 19**). Les modifications post-traductionnelles par phosphorylations contrôlent l'activité et les fonctions de l'annexine A2 au cours de l'exocytose. Au cours de la sécrétion, l'annexine A2 est phosphorylée sur sérine par la PKC (Gould et al., 1986). Un autre résidu important présent dans sa séquence N-terminale est la tyrosine en position 23. Cette phosphorylation affecte la liaison de l'annexine A2 à deux acteurs majeurs du processus d'exocytose, l'actine-F et les phospholipides. De ce fait, la Tyr<sup>23</sup> représente un point de régulation potentiel de l'annexine A2. Nous nous sommes donc intéressés au rôle de cette phosphorylation au cours de l'exocytose régulée dans les cellules chromaffines. Pour cette étude, nous avons réalisé des immunomarquages couplés à la microscopie confocale, combinés à des techniques biochimiques. Afin d'étudier l'importance fonctionnelle de cette phosphorylation, nous avons généré par mutagenèse dirigée des mutants non phosphorylable et phosphomimétique pour la Tyr<sup>23</sup> de l'annexine A2. Après avoir caractérisé la liaison des mutants aux lipides, nous avons étudié les effets de leur expression sur la formation des domaines lipidiques et sur la sécrétion.



**Figure 25 : L'annexine A2 est phosphorylée sur la Tyr<sup>23</sup> au cours de l'exocytose.**

**A.** Les cellules sont maintenues au repos 5 minutes dans une solution de Locke N (R) ou stimulées dans une solution de nicotine 20  $\mu$ M (S). Après fixation et perméabilisation, les cellules sont incubées avec des anticorps anti-P-Tyr et anti-annexine A2, visualisés avec les anticorps secondaires respectivement couplés aux fluorochromes Alexa-488 et Alexa-555. Les images ont été acquises au microscope confocal à balayage Leica SP5II avec les mêmes paramètres. Les masques sont obtenus en sélectionnant les pixels doublement marqués.

**B.** Après 5 minutes d'incubation dans du Locke N pour la condition repos (R) ou en présence de 20  $\mu$ M de nicotine pour la condition stimulée (S), les cellules ont été grattées dans du tampon de lyse puis soniquées. Les lysats obtenus ont été analysés par western-blot et révélés par chimioluminescence avec des anticorps anti-annexine A2, anti-annexine A2 P-Tyr<sup>23</sup> et anti-actine. Ce gel présente une expérience type, représentative de 3 expériences effectuées sur des cultures cellulaires différentes.

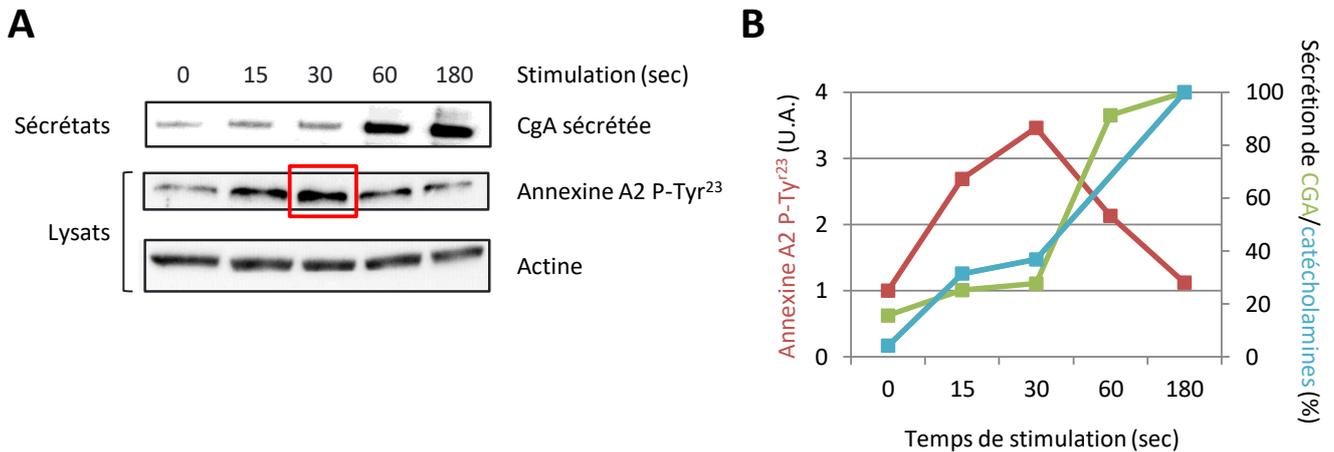
## 2) Résultats

### a) L'annexine A2 est phosphorylée sur la Tyr<sup>23</sup> au cours de l'exocytose

Pour déterminer si l'annexine A2 était phosphorylée sur tyrosine au cours de la sécrétion, une expérience d'immunocytochimie a été réalisée. Des doubles marquages pour mettre en évidence les protéines phosphorylées sur tyrosine et l'annexine A2 ont été observés au microscope confocal (**Figure 25, A**). Dans les cellules non stimulées, le marquage des tyrosines phosphorylées est ponctiforme et se trouve dans le cytoplasme où l'annexine A2 est également présente. Lorsque les cellules sont stimulées, les marquages des protéines phosphorylées sur tyrosine et de l'annexine A2 augmentent à la périphérie cellulaire. Les deux marquages colocalisent, suggérant que l'annexine A2 pourrait être phosphorylée sur tyrosine dans l'espace subplasmalemmal des cellules stimulées. L'anticorps dirigé contre les tyrosines phosphorylées marque toutefois toutes les protéines phosphorylées sur tyrosine à la périphérie des cellules stimulées. De nombreux acteurs de l'exocytose comme la PLD1, N-WASP ou la Phospholipid Scramblase-1 (PLSCR-1) étant également phosphorylables sur tyrosine, leur phosphorylation pourrait également expliquer l'augmentation de signal détecté (Sun et al., 2001, Ho et al., 2005, Torres et Rosen, 2006).

Afin de vérifier que l'annexine A2 était bien phosphorylée sur la Tyr<sup>23</sup> au cours de l'exocytose, nous avons utilisé un anticorps dirigé spécifiquement contre la forme phosphorylée de la Tyr<sup>23</sup> (P-Tyr<sup>23</sup>) de l'annexine A2. Nous avons préparé des lysats de cellules chromaffines maintenues au repos ou stimulées avec une solution de 20 µM de nicotine. Après électrophorèse et transfert, les membranes de nitrocellulose ont été hybridées à l'aide des anticorps anti-annexine A2, anti-annexine A2 P-Tyr<sup>23</sup> et anti-actine (**Figure 25, B**). L'analyse densitométrique des bandes, réalisée avec Image J, révèle que la proportion d'annexine A2 P-Tyr<sup>23</sup>, par rapport à la quantité d'annexine A2 totale, est 5 fois plus importante dans les cellules stimulées. L'annexine A2 est donc phosphorylée sur la Tyr<sup>23</sup> au cours de l'exocytose.

Pour déterminer à quel moment de la sécrétion l'annexine A2 est phosphorylée sur la Tyr<sup>23</sup>, des lysats préparés après différents temps de stimulation ont été analysés par western-blot (**Figure 26, A**). La phosphorylation de la Tyr<sup>23</sup> est maximale au bout de 15 à 30



**Figure 26 : L'annexine A2 est phosphorylée au début de la sécrétion.**

**A.** Après 15, 30, 60 ou 180 secondes de stimulation dans 20  $\mu$ M de nicotine ou dans du Locke N (pour la condition 0), les sécrétats sont récupérés puis les cellules sont lysées et soniquées. Les sécrétats sont ensuite analysés par western blot avec un anticorps dirigé contre la CgA et les lysats avec des anticorps anti-annexine A2 P-Tyr<sup>23</sup> et anti-actine, révélés par chimioluminescence. Ce gel présente une expérience type, représentative d'expériences effectuées sur 3 cultures cellulaires différentes.

**B.** Le graphique présente, en fonction du temps, la quantité d'annexine A2 P-Tyr<sup>23</sup> normalisée par rapport à l'actine (courbe rouge) ainsi que la sécrétion de CgA (courbe bleue) et de catécholamines (courbe verte) sur une même culture. La sécrétion des catécholamines a été déterminée par un dosage fluorimétrique.

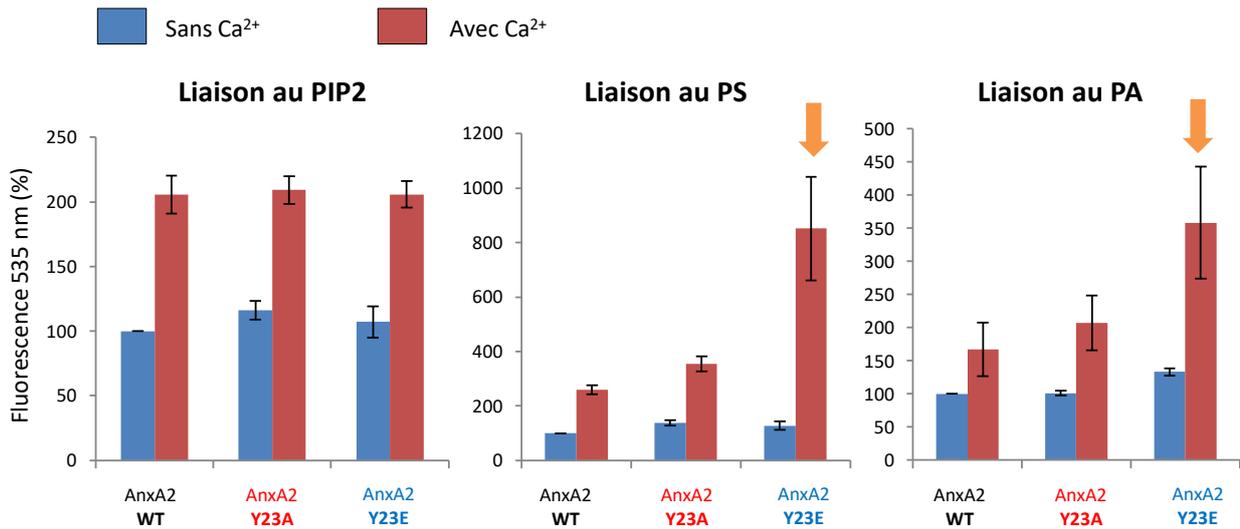
	1	23
	↓	↓
AnxA2 <b>WT</b> :	STVHEILCKLSLEGDHSTPPSA <u>Y</u> GSVKAYTNFD...	
AnxA2 <b>Y23A</b> :	STVHEILCKLSLEGDHSTPPSA <u>A</u> GSVKAYTNFD ...	
AnxA2 <b>Y23E</b> :	STVHEILCKLSLEGDHSTPPSA <u>E</u> GSVKAYTNFD ...	

*Vecteurs d'expression utilisés*



**Figure 27 : Génération par mutagenèse dirigée d'un mutant d'annexine A2 non phosphorylable (Y23A) et phosphomimétique (Y23E) pour la Tyr<sup>23</sup>.**

Le vecteur d'expression pEGFP-N3 contient en N-terminal le gène codant pour l'annexine A2 WT humaine, inséré entre les sites de restriction *BglII* et *SalI*, et en C-terminal, le gène codant pour la GFP (*Rescher et al, 2000*). Le vecteur d'expression pGEX-4T1 contient en N-terminal le gène codant pour la GST et en C-terminal, celui codant pour l'annexine A2 WT humaine, inséré entre les sites de restriction *BglII* et *SalI*.



**Figure 28 : Étude de la capacité à lier les lipides des mutants d'annexine A2 pour la Tyr<sup>23</sup>.**

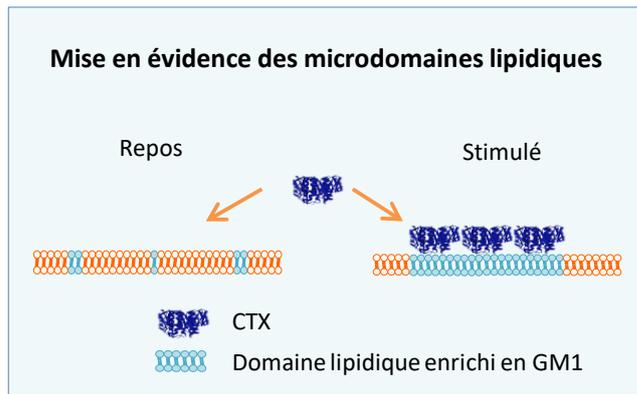
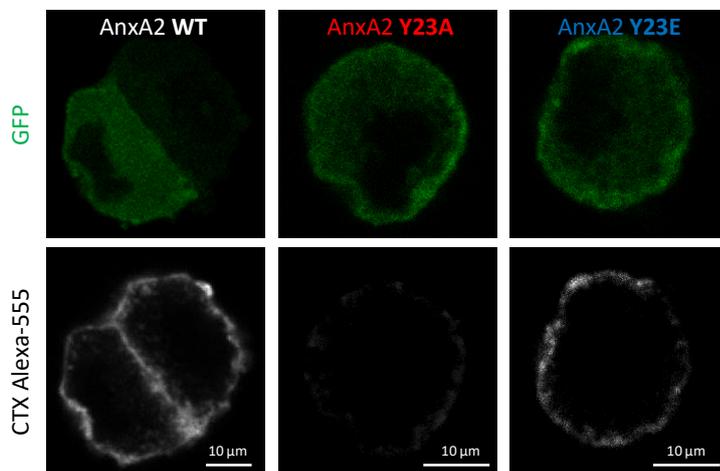
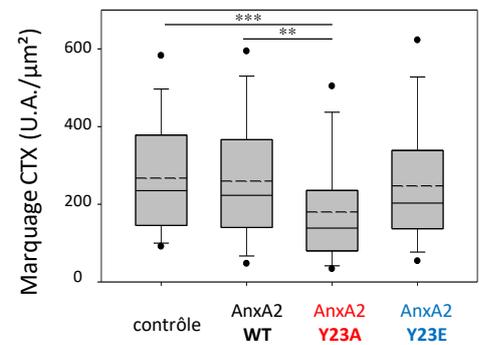
Différentes préparations de liposomes contenant 65% DOPC, 20% cholestérol, et 10% de PIP2, de PS ou de PA et 5% de PENBD, un lipide fluorescent, sont incubées avec les différentes protéines liées à des billes d'agarose couplées au glutathion (AnxA2-GST WT, Y23A et Y23E) en absence ou en présence de calcium. Après trois lavages, la fluorescence présente sur les billes est mesurée pour déterminer la quantité de liposomes liés. Les histogrammes présentent la quantité de fluorescence mesurée dans les différentes conditions. Les résultats présentés  $\pm$  SEM ont été normalisés par rapport à la condition sans calcium et correspondent à 9 mesures de 3 expériences indépendantes.

secondes de stimulation, ce qui correspond au début de la sécrétion des chromogranines et des catécholamines (**Figure 26, B**). Nous pouvons donc dire que la phosphorylation de la Tyr<sup>23</sup> de l'annexine A2 est un événement précoce de l'exocytose et qui précède la libération du contenu granulaire.

### **b) Génération de mutants non phosphorylable et phosphomimétique pour la Tyr<sup>23</sup>**

Pour étudier l'importance fonctionnelle de cette phosphorylation, nous avons généré, par mutagenèse dirigée, deux mutants de l'annexine A2 : un mutant non phosphorylable, dans lequel la Tyr<sup>23</sup> est remplacée par une alanine (Y23A), ainsi qu'un mutant phosphomimétique, dans lequel la Tyr<sup>23</sup> est remplacée par l'acide glutamique (Y23E) (**Figure 27**). Les différentes séquences ont été insérées dans deux vecteurs d'expression, l'un contenant la glutathion S-transférase (GST), et l'autre la Green Fluorescent Protein (GFP) (Rescher et al., 2000). Ce type de fusion à la GFP n'affecte pas les propriétés fonctionnelles et biochimiques de l'annexine A2 (Zobiack et al., 2001). L'annexine A2 est fusionnée à la GST pour les expériences de liaison *in vitro* et, à la GFP pour les études dans les cellules chromaffines.

La liaison des mutants au cytosquelette d'actine a été bien caractérisée dans la littérature. Le mutant phosphomimétique Y23E de l'annexine A2 sous forme de monomère, lie plus fortement l'actine (Rescher et al., 2008, Morel et Gruenberg, 2009) alors que sous forme tétramérique, elle n'est plus capable d'interagir avec l'actine, ni de former des faisceaux d'actine (Hubaishy et al., 1995). Sachant que la phosphorylation sur la Tyr<sup>23</sup> affecte aussi la liaison aux lipides, nous avons caractérisé la liaison des mutants à différents phospholipides présents au niveau du site d'exocytose. Les différentes constructions fusionnées à la GST ont été associées à des billes d'agarose couplées au glutathion puis incubées, avec ou sans calcium, en présence de liposomes fluorescents enrichis en PA, PIP<sub>2</sub> ou PS. La condition sans calcium constitue un contrôle pour chaque construction puisque l'annexine A2 lie les phospholipides de façon calcium-dépendante (Gerke et al., 2005). En présence de calcium, les deux mutants lient les liposomes enrichis en PIP<sub>2</sub> de la même façon que l'annexine A2 Wild Type (WT) (**Figure 28**). La phosphorylation de la Tyr<sup>23</sup> n'affecte donc pas la liaison de l'annexine A2 au PIP<sub>2</sub>. Par contre, le mutant d'annexine A2 Y23E lie 2,5 fois plus les liposomes enrichis en PA et en PS que l'annexine A2 WT en présence de calcium.

**A****B****C**

**Figure 29 : La phosphorylation de la Tyr<sup>23</sup> de l'annexine A2 est nécessaire à la formation des microdomaines lipidiques.**

**A.** Les microdomaines lipidiques sont identifiés grâce à la CTX couplée à un fluorochrome. La sous-unité β de cette toxine est capable de se lier à 5 molécules de GM1, ganglioside enrichi spécifiquement dans les domaines lipidiques.

**B.** Les cellules transfectées sont stimulées 10 minutes avec une solution de KCl 59 mM en présence de la CTX couplée à l'Alexa-555. Les images sont acquises au microscope confocal avec les mêmes paramètres.

**C.** Analyse semi-quantitative du marquage CTX à périphérie des cellules stimulées ± SEM (54 < n < 79). Le contrôle correspond aux cellules non transfectées. \*\*\* p < 0,001, \*\* p < 0,01 (test de Mann-Whitney).

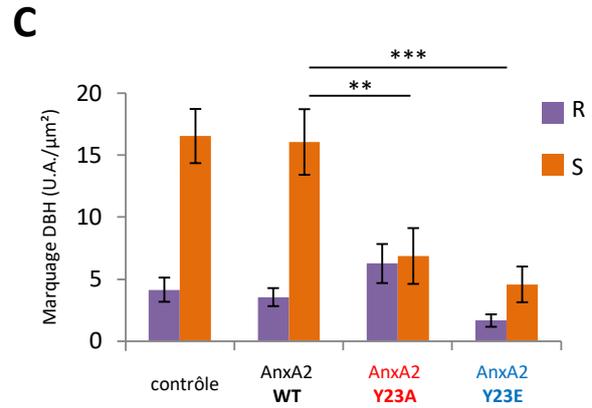
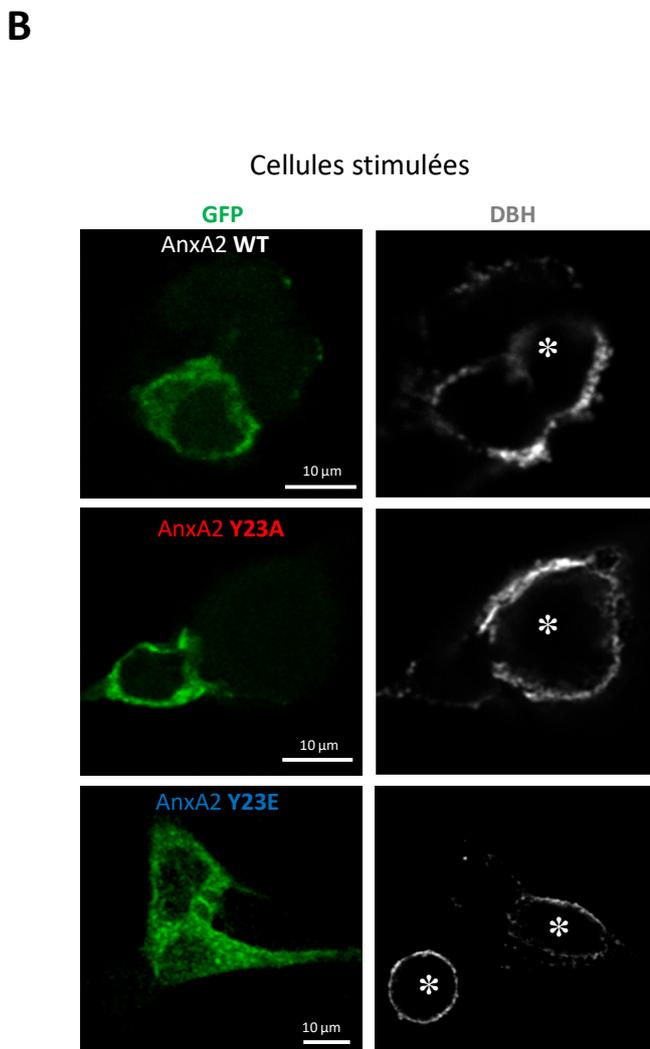
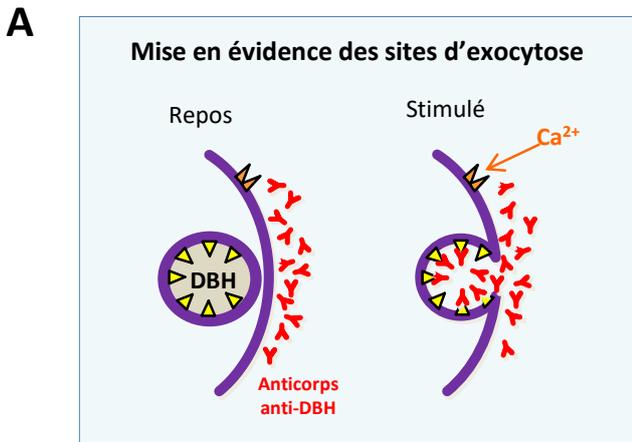
Cela signifie donc que la phosphorylation de la Tyr<sup>23</sup> de l'annexine A2 favorise sa liaison à certains phospholipides tels que le PA et le PS.

### **c) La phosphorylation de la Tyr<sup>23</sup> est nécessaire à la formation des domaines lipidiques**

Les trois constructions d'annexine A2 couplée à la GFP ont été transfectées dans les cellules chromaffines bovines. Nous avons d'abord vérifié que les mutants d'annexine A2 pour la Tyr<sup>23</sup> étaient recrutés à la membrane plasmique comme l'annexine A2 WT lors d'une stimulation. Nous avons ensuite étudié si la formation des domaines lipidiques était modifiée par la mutation de la Tyr<sup>23</sup>. Pour visualiser les microdomaines lipidiques, les cellules transfectées ont été stimulées en présence de la CTX fluorescente. En se liant à plusieurs molécules de GM1, la CTX permet de mettre en évidence la formation des domaines lipidiques (**Figure 29, A**). Dans les cellules exprimant le mutant Y23E, le marquage CTX observé est identique que dans les cellules non transfectées ou exprimant l'annexine A2 WT. À l'inverse, il y a une diminution du marquage CTX dans les cellules exprimant le mutant non phosphorylable Y23A de l'annexine A2 (**Figure 29, B**). L'analyse semi-quantitative du marquage confirme que l'expression du mutant Y23A inhibe la formation des domaines lipidiques (**Figure 29, C**). La phosphorylation de la Tyr<sup>23</sup> de l'annexine A2 est donc nécessaire à la formation des microdomaines lipidiques.

### **d) La phosphorylation de la Tyr<sup>23</sup> régule le processus d'exocytose**

Nous avons ensuite recherché quel était l'impact de cette phosphorylation au cours de la sécrétion. Pour ce faire, nous avons évalué l'activité sécrétrice des cellules transfectées en marquant les sites d'exocytose à l'aide d'un anticorps dirigé contre la DBH (**Figure 30, A**). La DBH est une enzyme présente sur la face interne des granules de sécrétion : elle est donc accessible aux anticorps uniquement lorsque le granule fusionne avec la membrane plasmique, au niveau du site d'exocytose. Les images obtenues au microscope confocal montrent, pour chaque condition, des cellules transfectées stimulées à côté de cellules non transfectées (indiquées par un astérisque) (**Figure 30, B**). Dans les cellules exprimant le mutant non phosphorylable Y23A ou phosphomimétique Y23E, une forte diminution du marquage DBH est observée par rapport aux cellules non transfectées présentes dans le



**Figure 30 : La phosphorylation de la Tyr<sup>23</sup> de l'annexine A2 affecte le processus d'exocytose.**

**A.** Les sites d'exocytose sont visualisés grâce à un anticorps dirigé contre la DBH. Cette enzyme est présente sur la face interne des granules de sécrétion et n'est accessible aux anticorps que lorsque les granules ont fusionné avec la membrane plasmique. Il y aura donc peu ou pas de marquage à la surface d'une cellule qui n'a pas été stimulée.

**B.** Les cellules transfectées ont été maintenues au repos dans une solution de Locke N (R) ou stimulées 10 minutes avec une solution de KCl 59 mM (S) contenant un anticorps dirigé contre la DBH. Après fixation, les cellules sont incubées avec un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-555. Les images montrent, pour chaque condition, une ou plusieurs cellules transfectées à côté de cellules non transfectées, indiquées par un astérisque (\*). Les images sont acquises au microscope confocal avec les mêmes paramètres.

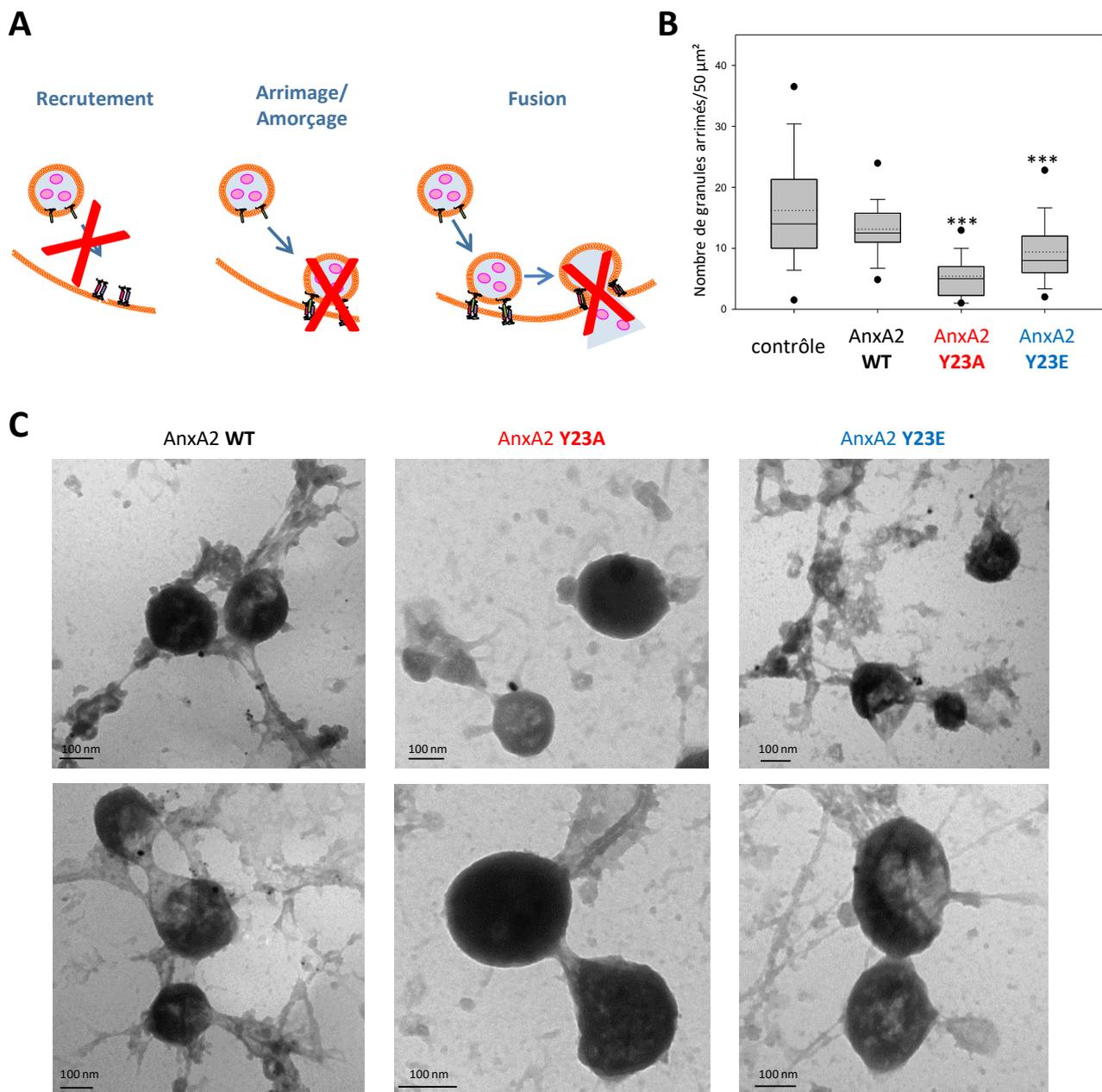
**C.** L'histogramme présente une analyse semi-quantitative de la quantité de DBH présente à la surface des cellules. La condition contrôle correspond aux cellules non transfectées. Les données représentent une valeur moyenne  $\pm$  SEM ( $n \geq 12$  cellules par condition). \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (test de Mann-Whitney).

même champ. L'analyse semi-quantitative du marquage DBH montre que l'activité sécrétrice des cellules exprimant les mutants d'annexine A2 est diminuée de plus de 60% par rapport aux cellules non transfectées (contrôle) ou exprimant la forme sauvage d'annexine A2 (**Figure 30, C**). L'expression des deux mutants d'annexine A2 diminue donc fortement le nombre de sites d'exocytose dans les cellules stimulées, ce qui montre l'importance fonctionnelle de la Tyr<sup>23</sup> de l'annexine A2 dans le processus de sécrétion neuroendocrine.

#### **e) L'annexine A2 affecte le recrutement des granules de sécrétion à la membrane plasmique**

Une explication possible à l'inhibition de l'exocytose par les deux mutants, est que l'annexine A2 subisse une phosphorylation puis une déphosphorylation au cours du processus de sécrétion. Nos résultats suggèrent que l'annexine A2 est dans un premier temps phosphorylée pour former les microdomaines lipidiques nécessaires au recrutement des granules puis qu'elle doit ensuite être déphosphorylée pour la fin du processus d'exocytose.

La diminution du nombre de site d'exocytose observée en immunocytochimie peut refléter plusieurs situations (**Figure 31, A**). Ces observations peuvent être dues soit à une diminution du nombre de granule recrutés, soit à un ancrage moins stable des granules, soit à l'inhibition de l'étape de fusion. Pour déterminer de façon plus précise quelle étape de l'exocytose est affectée par la phosphorylation, nous avons réalisé des feuillettes de membrane plasmique de cellules exprimant les deux mutants d'annexine A2. Dans un premier temps, nous avons compté le nombre de granules arrimés à la membrane plasmique. Pour identifier les feuillettes de cellules transfectées, nous avons utilisé un anticorps dirigé contre la GFP, visualisé avec des billes de 25 nm. La **figure 31 B** montre que dans les cellules exprimant le mutant Y23A, environ 3 fois moins de granules sont présents à la membrane plasmique par rapport aux cellules non transfectées (contrôle) ou exprimant l'annexine A2 WT. L'expression du mutant phosphomimétique inhibe lui aussi le recrutement des granules à la membrane mais, de façon moins importante puisqu'on en retrouve environ 2 fois moins que pour l'annexine A2 WT. L'état de phosphorylation de la Tyr<sup>23</sup> de l'annexine A2 affecte donc le recrutement des granules de sécrétion à la membrane plasmique.



**Figure 31 : La phosphorylation de la Tyr<sup>23</sup> de l'annexine A2 affecte le recrutement des granules de sécrétion à la membrane plasmique.**

**A.** Schéma présentant les étapes de l'exocytose dont l'inhibition entraîne une diminution du nombre de sites de fusion.

**B.** L'histogramme présente pour chaque condition, le nombre moyen de granules arrimés par image  $\pm$  SEM ( $n \geq 30$  images par condition). La condition contrôle correspond aux cellules non transfectées. \*\*\*  $p < 0,001$  (test de Mann-Whitney).

**C.** Observations au microscope électronique à transmission de feuillettes de membrane plasmique de cellules stimulées transfectées pour l'annexine A2 WT, Y23A ou Y23E.

De plus, à plus fort grossissement, nous avons observé que dans les cellules transfectées avec les mutants d'annexine A2, l'aspect des granules ancrés est différent (**Figure 31, C**). En effet, dans les cellules exprimant le mutant Y23A, les granules apparaissent lisses, indiquant qu'il n'y a pas d'actine à leur surface. Dans les cellules exprimant le mutant Y23E, les granules ont un manteau d'actine à leur surface mais celui-ci semble moins épais que dans les cellules exprimant l'annexine A2 WT. De plus, les granules apparaissent moins denses aux électrons ce qui signifie qu'ils sont à moitié vides et ne reflètent qu'une fusion partielle. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que l'annexine A2 doit être déphosphorylée pour permettre la fusion complète des granules de sécrétion. L'état de phosphorylation de la Tyr<sup>23</sup> de l'annexine A2 régule donc les étapes de recrutement et de fusion des granules de sécrétion à la membrane plasmique.

### 3) Discussion

Au cours de la sécrétion, l'annexine A2 participe à la formation des microdomaines lipidiques et des sites d'exocytose mais sa régulation au cours de ces processus n'est pas encore précisément connue. La partie N-terminale de l'annexine A2 contient de nombreux sites de phosphorylation qui modifient la structure tridimensionnelle de la protéine et régulent son affinité pour différents partenaires. Lors d'une stimulation nicotinique, l'activation de la PKC induit la phosphorylation de la serine 25, nécessaire au processus d'exocytose (Sarafian et al., 1991, Chasserot-Golaz et al., 1996). Pourtant, *in vitro*, cette phosphorylation inhibe la capacité de l'annexine A2 à agréger des vésicules lipidiques (Regnouf et al., 1995). Ces résultats, à priori contradictoires, suggèrent qu'au cours du processus d'exocytose, l'annexine A2 doit être phosphorylée puis déphosphorylée. Un tel cycle a d'ailleurs été décrit pour la serine 11 de l'annexine A2, au cours de la sécrétion du facteur von Willebrand par les cellules endothéliales (Brandherm et al., 2013).

Jusqu'à présent, l'importance de la phosphorylation de la Tyr<sup>23</sup> n'a encore jamais été étudiée au cours de l'exocytose, bien que cette phosphorylation modifie la liaison de l'annexine A2 aux membranes et à l'actine (Hubaishy et al., 1995), deux acteurs majeurs impliqués dans la formation et l'organisation des plateformes lipidiques. La phosphorylation inhibe en particulier la fasciculation de l'actine par l'annexine A2 dont nous venons de

montrer l'importance fonctionnelle (Gabel et al., 2015). Pour ces raisons, il nous a semblé important de rechercher si l'annexine A2 était phosphorylée sur sa Tyr<sup>23</sup> au cours de la sécrétion dans les cellules chromaffines et, si oui, quel était son rôle. Nos résultats mettent en évidence que l'annexine A2 est phosphorylée sur la Tyr<sup>23</sup> au cours du processus de sécrétion et que cette phosphorylation est nécessaire à la formation des domaines lipidiques ainsi qu'au recrutement des granules de sécrétion à la membrane plasmique. De plus les effets de l'expression du mutant phosphomimétique suggèrent que l'annexine A2 doit être déphosphorylée pour que l'arrimage et/ou la fusion des granules aient lieu. Il semble donc que l'annexine A2 soit soumise à un cycle de phosphorylation/déphosphorylation au cours de l'exocytose.

#### **a) La phosphorylation est nécessaire au recrutement des granules de sécrétion**

Un résultat important de cette étude est que la phosphorylation de la Tyr<sup>23</sup> est nécessaire au cours du processus de sécrétion. Nos résultats montrent que la phosphorylation a lieu juste après la stimulation de l'exocytose et qu'elle précède la libération de CgA et de catécholamines. Elle constitue donc un événement précoce du processus d'exocytose. Sachant que la Tyr<sup>23</sup> est plus exposée et accessible quand l'annexine A2 est associée à la membrane plasmique (Bellagamba et al., 1997) et que le changement de conformation engendré par la phosphorylation stabilise l'annexine A2 à la membrane (Morel et Gruenberg, 2009), l'annexine A2 pourrait être phosphorylée juste après sa translocation à la membrane pour permettre la formation et/ou la stabilisation des domaines lipidiques. Le fait que le mutant Y23E ait beaucoup plus d'affinité pour le PA et le PS que l'annexine A2 WT et qu'à l'inverse, le mutant Y23A inhibe la formation des microdomaines lipidiques, permet de conclure que l'annexine A2 doit être phosphorylée pour former les domaines lipidiques. L'augmentation de l'affinité pour le PA et le PS induite par la phosphorylation pourrait alors favoriser la formation de ces domaines.

L'analyse des feuilletts membranaires en microscopie électronique révèle que, dans les cellules exprimant le mutant Y23A non phosphorylable, le nombre de granules arrimés à la membrane plasmique est fortement réduit. Ceci est sans doute la conséquence de l'inhibition de la formation des domaines lipidiques et confirme les résultats obtenus avec le mutant d'annexine A2 qui n'a plus d'activité de fasciculation des filaments d'actine (Gabel et

al., 2015), c'est-à-dire que l'absence de domaines lipidiques inhibe le recrutement des granules parce que certaines protéines nécessaires à cette étape ne sont pas disponibles et concentrées au bon endroit pour permettre un arrimage efficace. De plus, lorsque le mutant Y23A est exprimé dans les cellules, les granules recrutés à la membrane plasmique apparaissent plus lisses, sans doute à cause de l'absence du manteau d'actine. La phosphorylation de la Tyr<sup>23</sup> de l'annexine A2 affecterait donc aussi ses interactions avec le cytosquelette d'actine. Sachant que l'annexine A2 doit être phosphorylée sur tyrosine pour activer les GTPases Rho impliquées dans la polymérisation du cytosquelette d'actine (Rescher et al., 2008), il est donc possible qu'un autre rôle de la phosphorylation de l'annexine A2 soit d'activer la cascade moléculaire qui permet la synthèse de filaments d'actine nécessaires à la stabilisation des microdomaines lipidiques. Une autre cible de l'annexine A2 phosphorylée pourrait aussi être Rac1, capable d'activer la PLD1 et la synthèse de PA requise pour le processus d'exocytose (Hansen et al., 2002).

### **b) Quel est le rôle de la déphosphorylation de la Tyr<sup>23</sup> ?**

Nos résultats montrent aussi, de façon surprenante, que l'expression du mutant phosphomimétique inhibe fortement le processus de sécrétion et affecte aussi le nombre de granules ancrés à la membrane plasmique. L'annexine A2 semble donc devoir être déphosphorylée pour que la dernière étape de l'exocytose, c'est-à-dire la fusion, ait lieu. La déphosphorylation pourrait donc se produire après l'amorçage des granules à la membrane plasmique. Deux hypothèses sont envisageables pour expliquer cette inhibition :

- 1- la phosphorylation pourrait inhiber l'activité de fasciculation de l'annexine A2 tétramérique (Hubaishy et al., 1995), les forces exercées par le manteau d'actine ne seraient donc pas suffisantes pour vider le granule.
- 2- la forme phosphorylée de l'annexine A2, ayant une affinité plus forte pour le PA, pourrait piéger le PA néosynthétisé et donc inhiber l'expansion du pore de fusion.

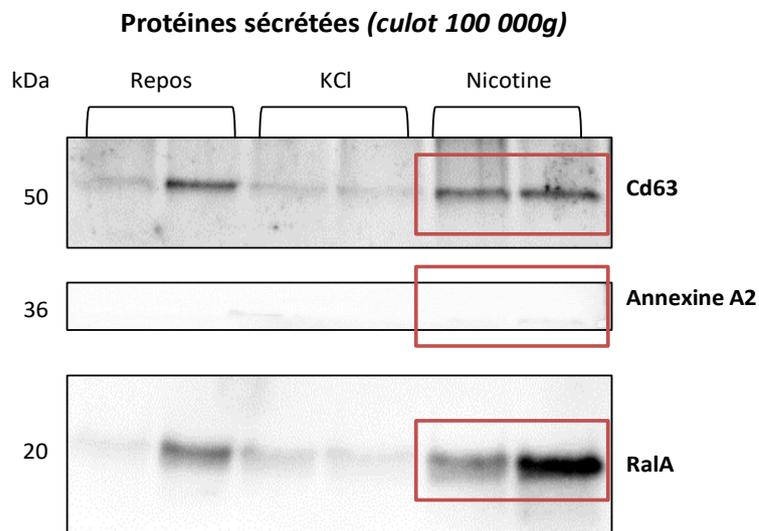
Pour confirmer ou infirmer ces hypothèses, des expériences d'ampérométrie pourront être réalisées afin de déterminer si la cinétique de fusion des événements d'exocytose est affectée et si la phosphorylation de la Tyr<sup>23</sup> de l'annexine A2 influence la vitesse et le nombre de catécholamines libérées par un granule de sécrétion.

## C. Étude de l'annexine A2 extracellulaire dans les cellules chromaffines

### 1) Introduction

Jusqu'à présent, les études sur l'annexine A2 dans les cellules chromaffines se sont concentrées sur son rôle intracellulaire. Mais, comme exposé dans la partie 4 du chapitre B de l'introduction, l'annexine A2 joue également un rôle à l'extérieur des cellules. L'annexine A2 extracellulaire a été décrite dans plusieurs modèles cellulaires comme dans les cellules endothéliales suite à un choc thermique (Deora et al., 2004) ou dans les fibroblastes lors d'une stimulation calcique (Valapala et Vishwanatha, 2011). La dépolarisation de neurones corticaux en culture provoque également l'apparition d'annexine A2 à leur surface, associée de façon calcium-dépendante avec la membrane plasmique (Zhao et Lu, 2007). Le rôle de l'annexine A2 extracellulaire dans les neurones pourrait être lié à son association avec le t-PA, qui intervient dans les processus de plasticité synaptique et de mémorisation (Calabresi et al., 2000) mais, qui est aussi impliqué dans la mort neuronale *via* l'activité de protéolyse de la plasmine (Tsirka, 2002). Dans les cellules photoréceptrices, il a aussi été mis en évidence que le glutamate était capable d'induire la translocation de l'annexine A2 P-Tyr<sup>23</sup> à la surface des cellules ainsi que la génération de plasmine (Valapala et al., 2014). Ces deux réactions pourraient participer à l'excitotoxicité due à l'excès de glutamate, mécanisme impliqué dans plusieurs dégénérescences rétiniennes (Vorwerk et al., 1999).

Dans les cellules chromaffines, une étude a montré que de l'annexine A2 était "sécrétée" de façon non conventionnelle dans le milieu extracellulaire suite à une stimulation nicotinique (Faure et al., 2002). Comme nous venons de mettre en évidence que l'annexine était P-Tyr<sup>23</sup> au cours de l'exocytose et qu'une des conséquences de cette phosphorylation était l'externalisation de l'annexine A2, c'est-à-dire son passage à travers la membrane plasmique (Deora et al., 2004, Valapala et al., 2014), nous avons recherché la présence d'annexine A2 à la surface des cellules chromaffines puis, après l'avoir caractérisée, nous avons étudié son lien avec l'exocytose régulée.



**Figure 32 : L'annexine A2 n'est pas présente dans les exosomes.**

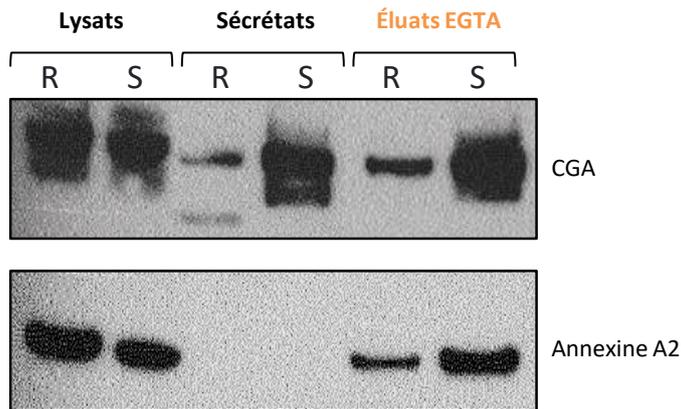
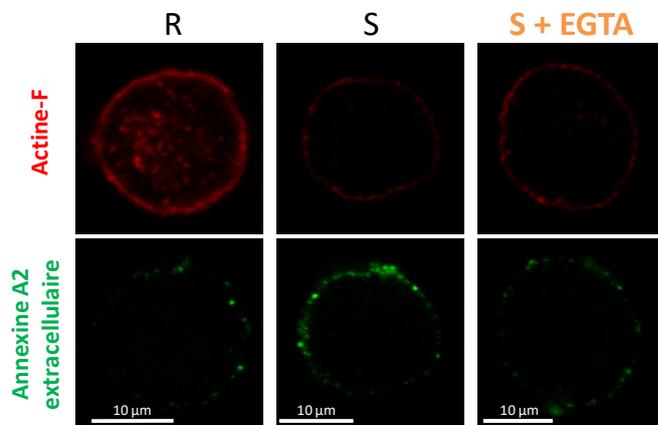
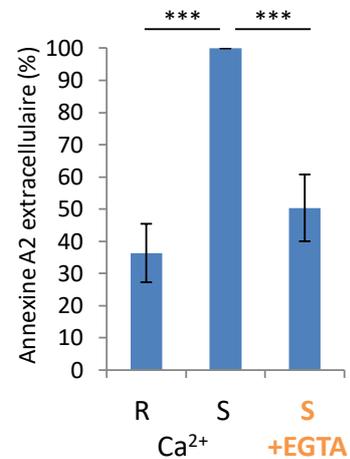
Les fractions contenant les exosomes sont analysées par western-blot avec des anticorps dirigés contre cd63 et RalA (marqueurs d'exosomes) et contre l'annexine A2. Ces résultats sont représentatifs d'une expérience type. Des résultats similaires ont été observés au cours d'expériences faites sur 2 cultures de cellules chromaffines.

## 2) Résultats

Dans les neurones, des exosomes sont sécrétés suite à une dépolarisation cellulaire, cette sécrétion pouvant être régulée par le glutamate (Faure et al., 2006, Lachenal et al., 2011). Sachant que de l'annexine A2 a été trouvée dans le milieu extracellulaire des cellules chromaffines suite à une stimulation (Faure et al., 2002) et que dans certains modèles, l'annexine A2 est associée aux exosomes (McCready et al., 2010, Valapala et Vishwanatha, 2011), nous avons dans un premier temps recherché si des exosomes étaient sécrétés par les cellules chromaffines suite à une stimulation (**Figure 32**). La présence de marqueurs d'exosomes tels que cd63 et RalA (Hyenne et al., 2015) dans les sécrétats, suggère que des exosomes sont bien sécrétés dans le milieu extracellulaire par les cellules chromaffines stimulées. Nous avons ensuite recherché l'annexine A2 dans ces fractions. Nos résultats montrent que l'annexine A2 n'est pas présente dans la fraction contenant les exosomes et qu'elle n'est donc pas sécrétée dans le milieu extracellulaire par la voie exosomale chez les cellules chromaffines. Il est toutefois intéressant de noter que la sécrétion d'exosomes n'avait encore jamais été montrée dans les cellules chromaffines. Les exosomes sont majoritairement sécrétés suite à une stimulation nicotinique, sûrement *via* une signalisation dépendante de l'activation des récepteurs cholinergiques. La sécrétion d'exosomes pourrait donc constituer un deuxième type de réponse à une stimulation nicotinique.

### a) L'annexine A2 lie la face externe des cellules stimulées de façon calcium-dépendante

Dans d'autres modèles, l'annexine A2 traverse la membrane plasmique et se lie à la surface des cellules de façon calcium-dépendante (Deora et al., 2004, Zhao et Lu, 2007). Nous avons donc étudié si l'annexine A2 était présente sur la face externe des cellules chromaffines après une stimulation nicotinique. La présence d'annexine A2 a été recherchée dans les lysats, dans les sécrétats contenant les protéines sécrétées comme la CgA, constituant majoritaire des granules de sécrétion, et dans les éluats EGTA, contenant les protéines liées à la membrane de façon calcium-dépendante. Le protocole est détaillé dans la partie Matériels et méthodes, pages 132-133. La **figure 33 A** montre que l'annexine A2 n'est pas présente dans les sécrétats, indiquant qu'elle n'est pas libérée sous forme soluble dans le milieu extracellulaire. Par contre, l'annexine A2 est détectée en grande quantité

**A****B****C**

**Figure 33 : Dans les cellules stimulées, l'annexine A2 lie la face externe des cellules chromaffines de façon calcium-dépendante.**

**A.** Les cellules sont maintenues au repos dans une solution de Locke N (R) ou stimulées dans une solution de nicotine 20 μM (S) pendant 5 minutes et les différentes fractions obtenues sont analysées par western-blot avec des anticorps dirigés contre la CgA et l'annexine A2, révélés par chimioluminescence. Ce gel présente une expérience type, représentative d'expériences effectuées sur 3 cultures cellulaires indépendantes.

**B.** Visualisation de l'annexine A2 à la surface de cellules chromaffines maintenues au repos dans du Locke N (R) ou stimulées 10 minutes avec une solution de nicotine 20 μM (S) en présence d'un anticorps anti-annexine A2. Elles sont ensuite lavées avec un tampon contenant du calcium ou de l'EGTA avant d'être fixées, puis incubées avec un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-488 et avec de la phalloïdine-TRITC pour visualiser l'actine-F. Les images sont acquises au microscope confocal à balayage Leica SP5II avec les mêmes paramètres.

**C.** L'histogramme présente l'analyse semi-quantitative du marquage de l'annexine A2 à la périphérie cellulaire, normalisé par rapport à la quantité d'annexine A2 détectée en condition stimulée, ± SEM de 3 expériences indépendantes (30 < n < 65). \*\*\* p < 0,001 (test de Mann-Whitney).

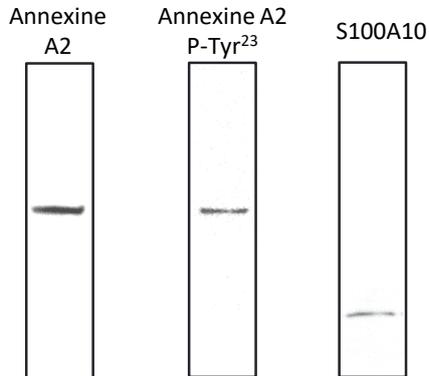
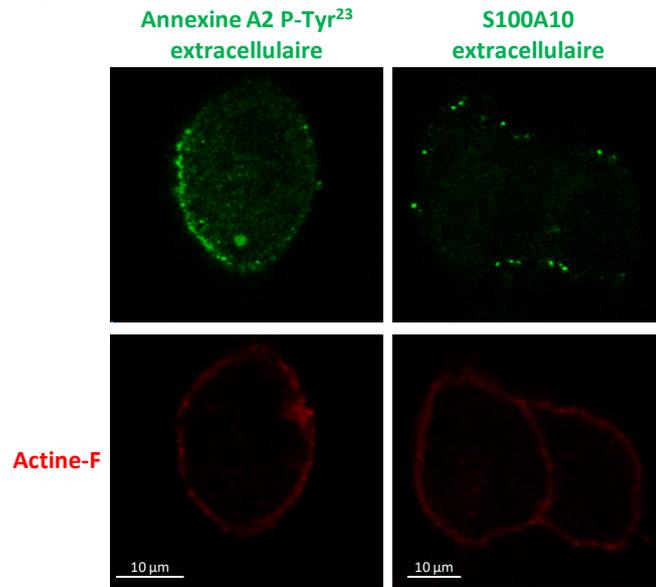
dans les éluats EGTA dans des cellules stimulées. Nous avons ensuite vérifié que l'annexine A2 détectée n'était pas due à la lyse des cellules en dosant l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH). La LDH est une enzyme cytoplasmique présente dans le milieu extracellulaire seulement en cas de lyse cellulaire. L'activité LDH présente dans les fractions EGTA étant inférieure à 1%, la présence d'annexine A2 dans le milieu extracellulaire n'est pas une conséquence de la lyse cellulaire mais est due à sa translocation sur la face externe de la membrane plasmique suite à une stimulation nicotinique.

Ce résultat a été confirmé par des immunomarquages (**Figure 33, B**). Pour visualiser l'annexine A2 à la surface des cellules, les cellules vivantes ont été incubées en présence d'anticorps dirigés contre l'annexine A2 puis ont été fixées mais non perméabilisées. Après révélation avec un anticorps secondaire, le marquage observé est donc situé uniquement sur la face externe des cellules. L'observation au microscope confocal montre que l'intensité du marquage de l'annexine A2 est plus importante à la surface des cellules stimulées. Si après stimulation les cellules sont lavées dans un milieu sans calcium avant d'être fixées, l'intensité du marquage extracellulaire diminue (**Figure 33, C**). L'annexine A2 est donc présente à la surface des cellules chromaffines stimulées et sa liaison à la membrane plasmique est calcium-dépendante.

## **b) Caractérisation de l'annexine A2 extracellulaire**

Nous avons ensuite caractérisé l'annexine A2 extracellulaire. Les expériences de biochimie mettent en évidence la présence d'annexine A2 P-Tyr<sup>23</sup> et de la protéine S100A10 dans l'éluat EGTA de cellules stimulées (**Figure 34, A**). Des immunomarquages ont confirmés ces résultats (**Figure 34, B**), démontrant la présence de la forme P-Tyr<sup>23</sup> d'annexine A2 ainsi que de la protéine S100A10 sur la face externe des cellules chromaffines stimulées.

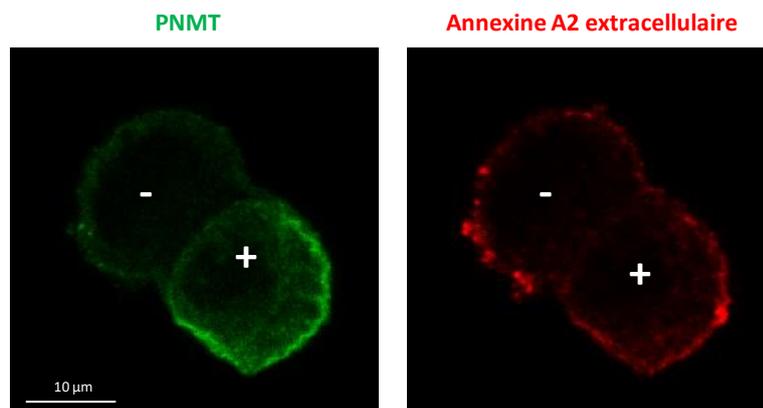
Sachant que S100A10 est exprimée uniquement dans les cellules adrénergiques (Chasserot-Golaz et al., 1996), nous avons recherché si l'annexine A2 était présente à la surface de toutes les cellules chromaffines ou uniquement à la surface des cellules adrénergiques exprimant la PNMT. Pour répondre à cette question, nous avons effectué des doubles marquages de l'annexine A2 extracellulaire et de la PNMT intracellulaire. La **figure 35** montre que l'annexine A2 transloque à la surface de toutes les cellules chromaffines.

**A****Eluat EGTA de cellules stimulées****B**

**Figure 34 : Le tétramère d'annexine A2 P-Tyr<sup>23</sup> est présent sur la face externe des cellules stimulées.**

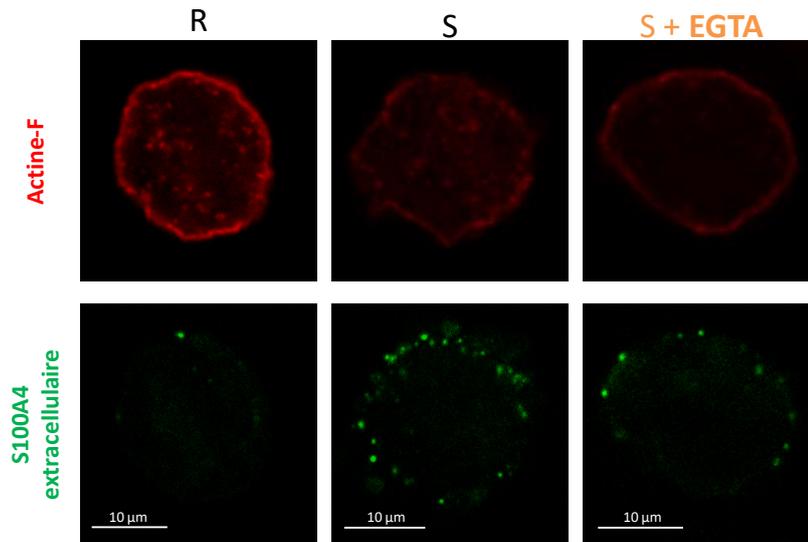
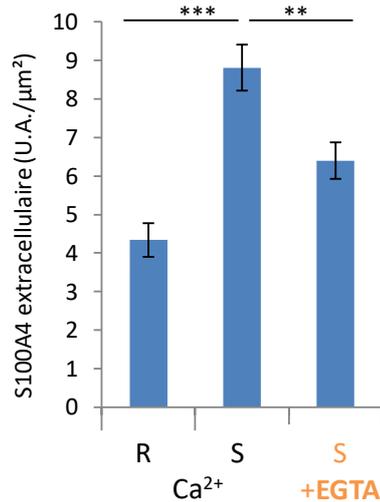
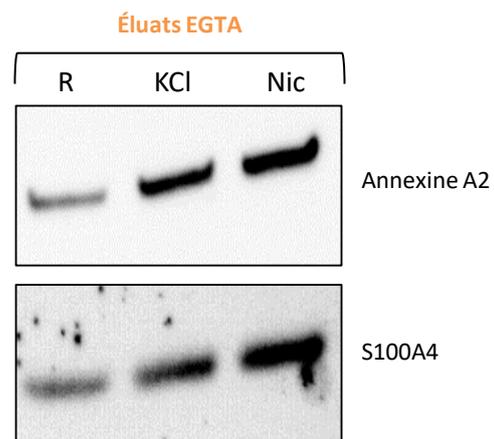
**A.** L'éluat EGTA de cellules stimulées par 20 μM de nicotine est analysé par western-blot avec des anticorps dirigés contre l'annexine A2, l'annexine A2 P-Tyr<sup>23</sup> et la S100A10.

**B.** Visualisation de l'annexine A2 P-Tyr<sup>23</sup> et de la S100A10 à la surface des cellules chromaffines stimulées 10 minutes dans une solution de nicotine 20 μM en présence d'un anticorps dirigé contre l'annexine A2 P-Tyr<sup>23</sup> ou contre la protéine S100A10. Elles sont ensuite fixées, incubées avec un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-488 puis avec de la phalloïdine-TRITC afin de visualiser les cellules. Les images sont acquises au microscope confocal.



**Figure 35 : L'annexine A2 est présente à la surface des cellules adrénergiques et noradrénergiques.**

Les cellules vivantes sont stimulées 10 minutes dans une solution de nicotine 20 μM en présence d'un anticorps dirigé contre l'annexine A2. Elles sont ensuite fixées, perméabilisées puis incubées avec un anticorps anti-PNMT. Les anticorps primaires sont révélés avec des anticorps secondaires couplés à l'Alexa-488 pour la PNMT et à l'Alexa-555 pour l'annexine A2. Les images sont acquises au microscope confocal.

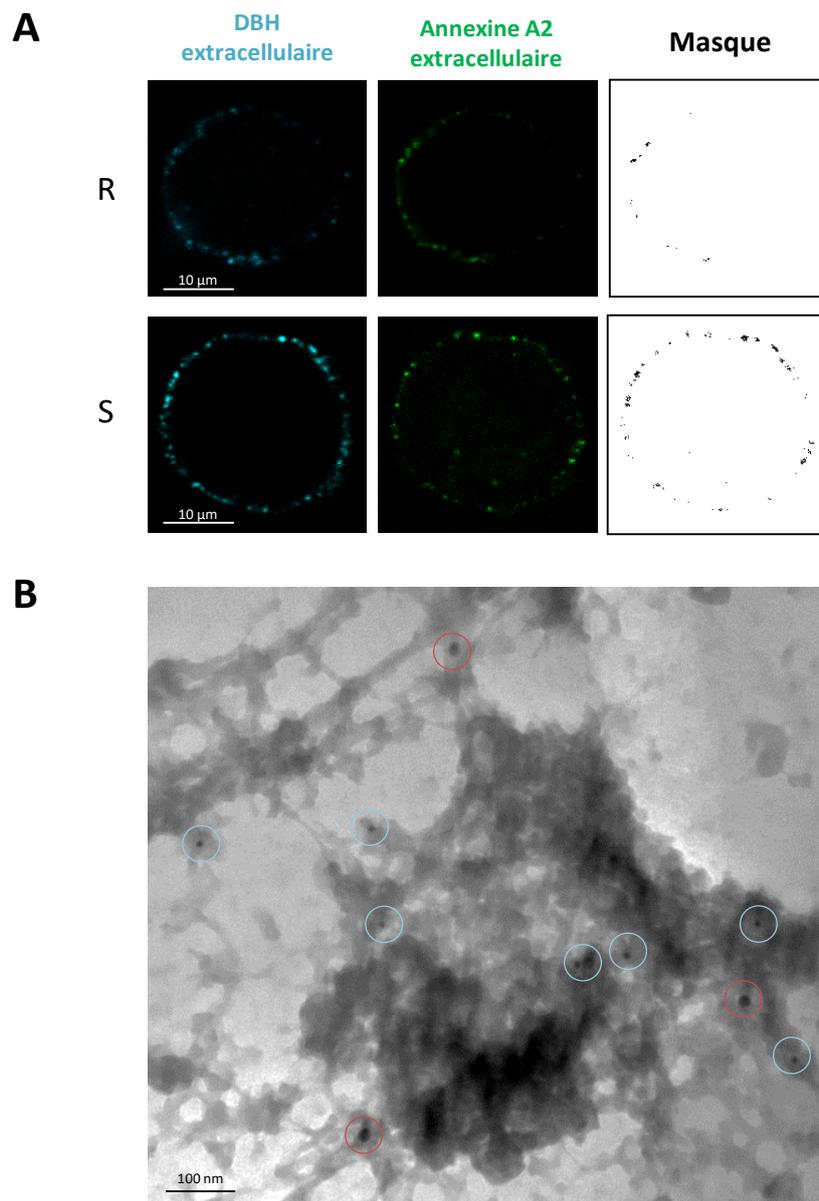
**A****B****C**

**Figure 36 : Dans les cellules stimulées, la protéine S100A4 est liée à la face externe de façon calcium-dépendante.**

**A.** Les cellules vivantes sont maintenues au repos dans du Locke N (R) ou stimulées 10 minutes avec une solution de nicotine 20 μM (S) en présence d'un anticorps anti-S100A4. Elles sont ensuite lavées dans un tampon contenant du calcium ou de l'EGTA avant d'être fixées, puis incubées avec un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-488 et avec de la phalloïdine-TRITC pour visualiser les cellules. Les images sont acquises au microscope confocal avec les mêmes paramètres.

**B.** L'histogramme présente l'analyse semi-quantitative du marquage de S100A4 à la périphérie cellulaire ± SEM de 2 expériences indépendantes (23 < n < 36). \*\*\* p < 0,001, \*\* p < 0,01 (test de Mann-Whitney).

**C.** Les éluats EGTA de cellules maintenues au repos (R) ou stimulées par 59 mM de KCl (KCl) et 20 μM de nicotine (Nic) sont analysés par western-blot avec des anticorps contre l'annexine A2 et la S100A14.



**Figure 37 : Dans les cellules stimulées, l'annexine A2 extracellulaire est située à proximité des sites de fusion des granules de sécrétion.**

Les cellules vivantes sont maintenues au repos dans du Locke N (R) ou stimulées 10 minutes avec une solution de nicotine 20  $\mu$ M (S) en présence d'anticorps contre l'annexine A2 et la DBH.

**A.** Les cellules sont fixées puis incubées avec des anticorps secondaires respectivement couplés à l'Alexa-488 et à l'Alexa-647. Les images sont acquises au microscope confocal et les masques sont obtenus en sélectionnant les pixels doublement marqués. Le pourcentage de colocalisation de l'annexine A2 avec la DBH est de 11,7% dans les cellules au repos (n=20) et de 65,5% dans les cellules stimulées (n=27).

**B.** Après réalisation des feuillettes de membrane plasmique et fixation, les marquages annexine A2 et DBH sont révélés à l'aide d'anticorps secondaires couplés à des billes d'or de, respectivement 15 nm (cercle rouge) et 10 nm (cercle bleu) et observés au microscope électronique à transmission.

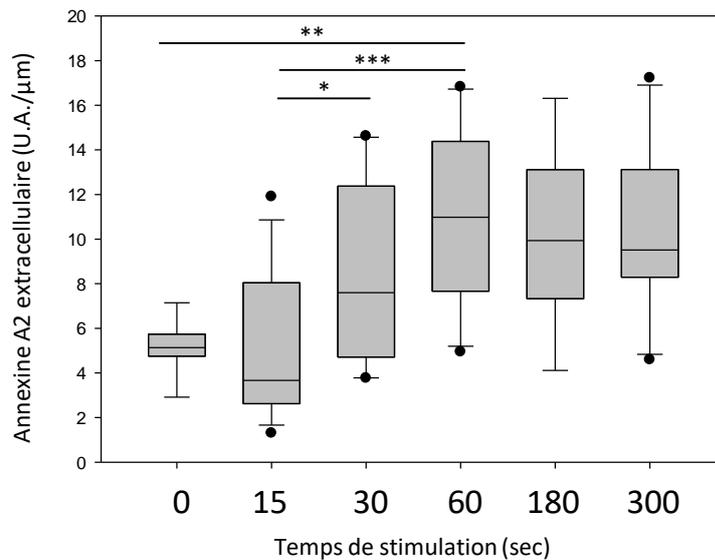
Sachant que seule l'annexine A2 tétramérique transloque à la surface des cellules, elle doit interagir avec un partenaire différent de S100A10 dans les cellules noradrénergiques. Dans la littérature, il a été montré, dans les cellules endothéliales, que l'annexine A2 extracellulaire forme un tétramère avec la protéine S100A4 (Semov et al., 2005). Après avoir vérifié que la S100A4 était présente dans les cellules chromaffines, nous avons voulu savoir si cette protéine était également présente à la surface des cellules chromaffines stimulées. Avec les mêmes protocoles utilisés pour étudier l'annexine A2 extracellulaire, nous avons démontré à l'aide d'immunomarquages (**Figure 36, A + B**) et d'expériences de biochimie (**Figure 36, C**) que la S100A4 se comportait comme l'annexine A2, c'est-à-dire qu'elle lie de façon calcium-dépendante la face externe des cellules chromaffines stimulées. L'annexine A2 pourrait donc former un hétérotétramère avec la protéine S100A4 pour traverser la membrane plasmique des cellules noradrénergiques.

### **c) L'externalisation de l'annexine A2 est liée au processus d'exocytose**

#### **i. Colocalisation de l'annexine A2 extracellulaire avec les sites de fusion**

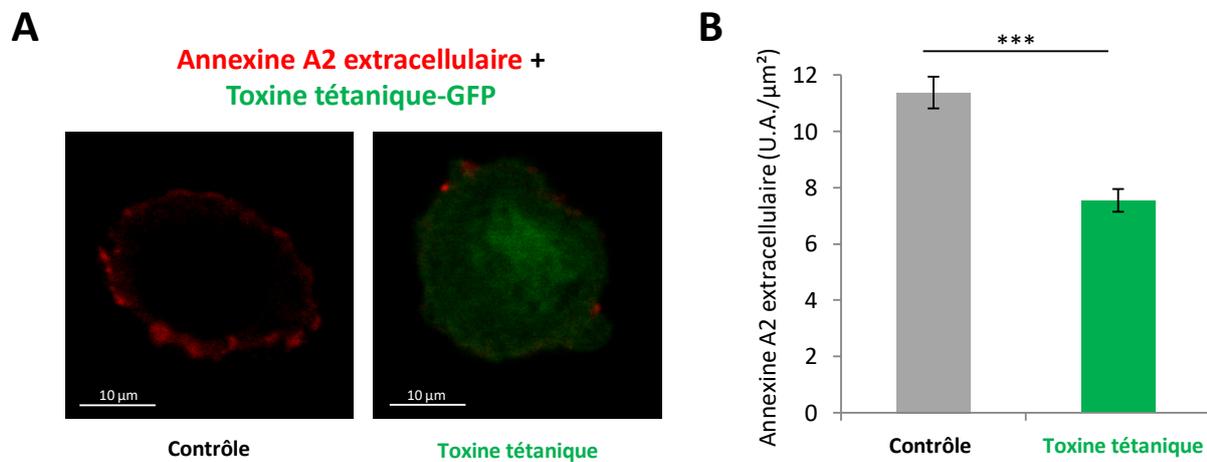
La sortie d'annexine A2 faisant suite à une stimulation des cellules, nous nous sommes demandé si ce phénomène était couplé au processus d'exocytose. Dans un premier temps, nous avons réalisé des doubles marquages de l'annexine A2 extracellulaire et des sites de fusion des granules avec un anticorps anti-DBH (**Figure 37, A**). Nos observations au microscope confocal montrent que, lorsque les cellules sont au repos, l'intensité des marquages de l'annexine A2 et de la DBH à la surface cellulaire est très faible. Par contre, lorsque les cellules sont stimulées, il y a une augmentation de l'intensité des deux marquages ainsi que du pourcentage de colocalisation entre l'annexine A2 et la DBH (65,5%). Après une stimulation, l'annexine A2 extracellulaire colocalise donc avec les sites de fusion des granules. À l'échelle ultrastructurale, des feuillettes de membrane plasmique visualisés en microscopie électronique montrent que l'annexine A2 extracellulaire se trouve juste à côté des sites de fusion des granules de sécrétion (**Figure 37, B**).

Nous avons ensuite regardé si la cinétique de l'externalisation était comparable à celle du processus de sécrétion. Après différents temps de stimulation, les cellules sont placées 20 minutes sur glace en présence de l'anticorps anti-annexine A2. Cette adaptation



**Figure 38 : Cinétique d'externalisation de l'annexine A2 au cours de l'exocytose.**

L'histogramme présente l'analyse semi-quantitative du marquage de l'annexine A2 à la périphérie cellulaire d'une expérience représentative  $\pm$  SEM ( $8 < n < 13$ ). Les mêmes résultats ont été obtenus sur 2 cultures indépendantes. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$  (test de Mann-Whitney).



**Figure 39 : La toxine tétanique diminue la sortie d'annexine A2 sur la face externe des cellules stimulées.**

**A.** Des cellules exprimant la toxine tétanique-GFP sont stimulées 10 minutes dans une solution de KCl 59 mM en présence d'un anticorps dirigé contre l'annexine A2. Après fixation, un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-555 permet de révéler l'annexine A2. Les images sont acquises au microscope confocal avec les mêmes paramètres.

**B.** L'histogramme présente l'analyse semi-quantitative du marquage de l'annexine A2 à la périphérie cellulaire  $\pm$  SEM de 3 expériences indépendantes ( $86 < n < 99$ ). \*\*\*  $p < 0,001$  (test de Mann-Whitney).

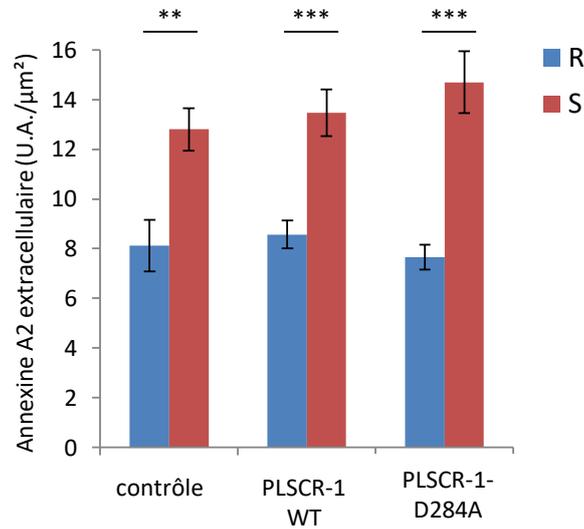
du protocole était nécessaire à cause des temps très courts de stimulation. L'analyse semi-quantitative du marquage de l'annexine A2 extracellulaire montre que l'externalisation d'annexine A2 est visible dès 30 secondes de stimulation et maximale au bout de 60 secondes (**Figure 38**). La cinétique d'externalisation de l'annexine A2 est donc cohérente avec la cinétique de sécrétion (**Figure 26, B**). De plus, elle est aussi comparable à la cinétique de phosphorylation de la Tyr<sup>23</sup> de l'annexine A2 au cours de l'exocytose (**Figure 26, A**), ce qui est en accord avec nos résultats précédents montrant que l'annexine A2 extracellulaire est P-Tyr<sup>23</sup> (**Figure 34**).

## ii. Importance du complexe SNARE

Pour confirmer le lien entre l'externalisation d'annexine A2 et l'exocytose, nous nous sommes demandés si la formation du complexe SNARE était nécessaire à la sortie d'annexine A2. Pour cela, nous avons exprimé dans les cellules chromaffines stimulées, un plasmide bicistronique codant pour la GFP et la toxine tétanique qui clive spécifiquement la protéine VAMP2 du complexe SNARE (Ahnert-Hilger et Bigalke, 1995) (**Figure 39**). Lorsque la protéine VAMP2 est clivée et que les complexes SNARE ne sont plus formés, la translocation de l'annexine A2 sur la face externe des cellules est réduite. Les mêmes observations ont été obtenues en exprimant dans les cellules la toxine botulique C qui clive la SNAP-25 et la syntaxine-1. L'externalisation de l'annexine A2 dépend donc de la formation des complexes SNARE et par conséquent, du processus d'exocytose.

## iii. Implication de la liaison de l'annexine A2 au PS

Dans les cellules chromaffines, au cours du processus d'exocytose, une sortie de PS a été observée, impliquant la protéine PLSCR-1 (Ory et al., 2013). L'annexine A2 possédant une forte affinité pour le PS, une hypothèse pouvait être que, lors d'une stimulation, l'annexine A2 transloque en étant liée au PS. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons inhibé la sortie de PS en surexprimant la protéine PLSCR-1 mutée (PLSCR-1-D284A). Des marquages immunocytochimiques de l'annexine A2 extracellulaire ont ensuite été réalisés. Dans les cellules exprimant la forme mutée de la PLSCR-1 dans lesquelles l'externalisation de PS est réduite, le marquage de l'annexine A2 à la surface des cellules n'est pas modifié (**Figure 40**). Ceci signifie que même lorsque l'externalisation de PS est bloquée, l'annexine transloque sur la face externe de la membrane plasmique. La sortie de PS, liée à l'activité de la PLSCR-1,



**Figure 40 : La surexpression de la protéine PLSCR-1 WT ou mutée n’affecte pas la sortie d’annexine A2 dans les cellules stimulées.**

Les cellules sont transfectées avec un plasmide codant pour la PLSCR-1 WT ou pour la PLSCR-1 mutée (PLSCR-1-D284A, mutant insensible au calcium) ou pour la GFP (contrôle). L’histogramme présente l’analyse semi-quantitative du marquage de l’annexine A2 à la périphérie cellulaire  $\pm$  SEM de 2 expériences indépendantes ( $14 < n < 34$ ). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  (test de Mann-Whitney).

n'est donc pas nécessaire au processus d'externalisation de l'annexine A2.

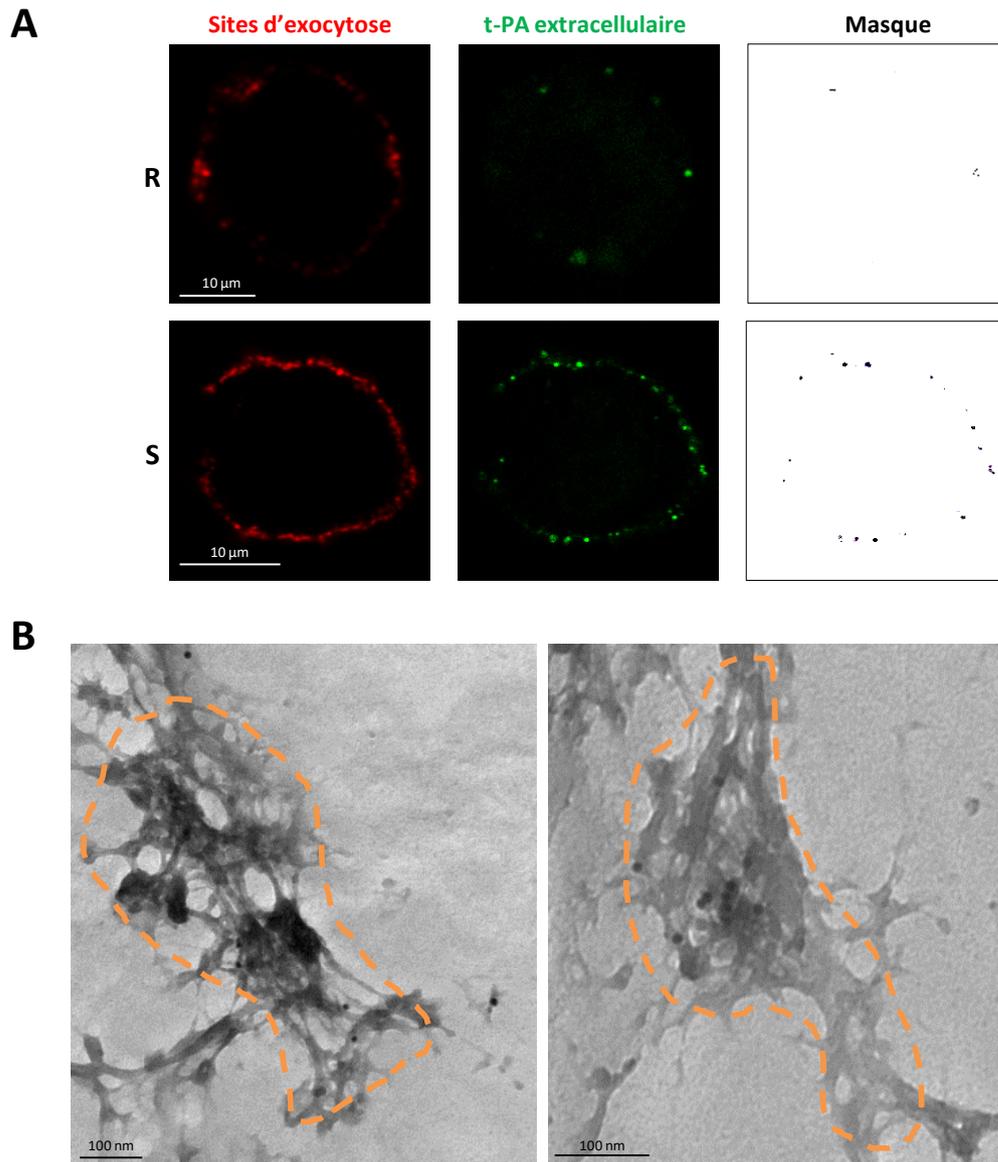
En résumé, nos résultats mettent en évidence que l'externalisation de l'annexine A2 est un événement précoce du processus de sécrétion, lié à la formation du complexe SNARE mais indépendant de l'externalisation du PS.

#### **d) L'annexine A2 peut-elle être le co-récepteur du t-PA à la surface des cellules chromaffines ?**

Finalement, nous nous sommes intéressés au rôle de l'annexine A2 extracellulaire dans les cellules chromaffines. Le premier rôle connu du tétramère d'annexine A2 extracellulaire est celui de co-récepteur du t-PA (Kim et Hajjar, 2002). Le tétramère est capable de capter le plasminogène circulant et le t-PA, favorisant ainsi la génération de plasmine. Dans les cellules chromaffines, le t-PA est présent dans les granules de sécrétion (Santell et al., 1999). Après libération, il lie un récepteur de nature encore inconnue à la surface des cellules chromaffines (Parmer et al., 2000), et l'annexine A2 pourrait être ce récepteur non identifié.

##### **i. Le t-PA extracellulaire est présent à proximité des sites d'exocytose**

Dans un premier temps, nous avons vérifié que le t-PA était présent à la surface des cellules chromaffines en effectuant un immunomarquage avec un anticorps anti-t-PA. Les observations au microscope confocal montrent que du t-PA est bien présent sur la face externe des cellules chromaffines stimulées. Un double marquage avec un anticorps anti-DBH révèle que, dans les cellules stimulées, 73% du t-PA extracellulaire colocalise avec la DBH extracellulaire (**Figure 41, A**). Holz et ses collaborateurs avaient déjà observé cette colocalisation à la surface des cellules chromaffines surexprimant le t-PA-cerulean (Weiss et al., 2014a). Ils ont suggéré que la présence de t-PA sur la face externe était due à son association avec la membrane granulaire, insérée dans la membrane plasmique lors du processus de fusion. Pour lever l'incertitude, nous avons regardé à l'échelle ultrastructurale. La **figure 41 B** montre que le t-PA n'est pas présent au niveau des patchs de DBH, qui correspondent à l'insertion de la membrane granulaire dans la membrane plasmique après fusion (Ceridono et al., 2011). Ceci suggère que les deux protéines ne colocalisent pas et que le t-PA présent à la surface des cellules n'est donc pas une conséquence de sa liaison à la

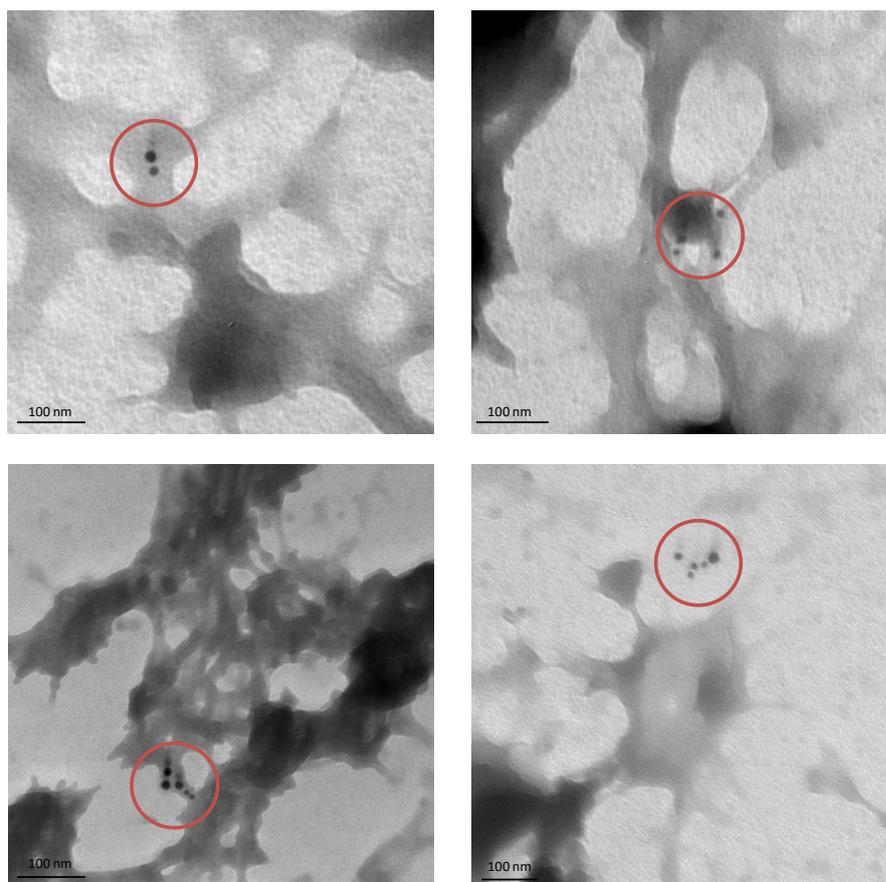


**Figure 41 : Le t-PA extracellulaire est situé à proximité des sites d'exocytose.**

Les cellules vivantes sont maintenues au repos dans du Locke N (R) ou stimulées 10 minutes avec une solution de nicotine 20  $\mu$ M (S) en présence d'anticorps dirigés contre le t-PA et la DBH.

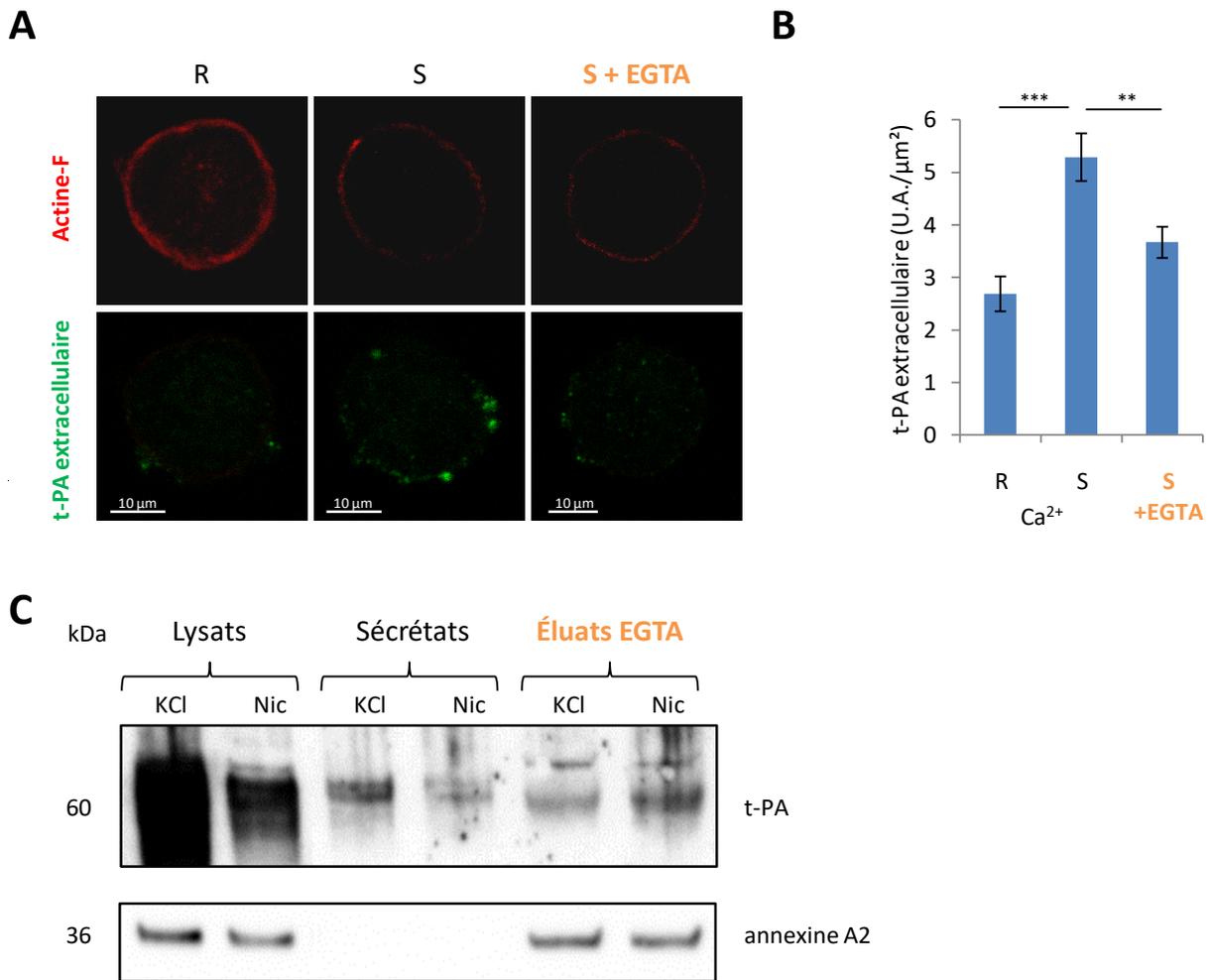
**A.** Les cellules sont fixées puis incubées avec des anticorps secondaires respectivement couplés à l'Alexa-488 et à l'Alexa-555. Les images sont acquises au microscope confocal et les masques sont obtenus en sélectionnant les pixels doublement marqués. Le pourcentage de colocalisation du t-PA avec la DBH est de 12,4% dans les cellules au repos (n=21) et de 73% dans les cellules stimulées (n=33).

**B.** Après réalisation des feuillettes de membrane plasmique et fixation, les marquages t-PA et DBH sont révélés à l'aide d'anticorps secondaires couplés à des billes d'or de respectivement 15 et 10 nm. Les feuillettes sont observés au microscope électronique à transmission. Les pointillés délimitent plus précisément la zone d'insertion de la membrane granulaire dans la membrane plasmique.



**Figure 42 : Le t-PA et l'annexine A2 extracellulaires colocalisent à la surface des cellules stimulées.**

Les cellules sont stimulées pendant 10 minutes avec une solution de nicotine 20  $\mu$ M contenant des anticorps dirigés contre le t-PA et l'annexine A2. Après réalisation des feuillettes de membrane plasmique et fixation, les marquages sont révélés à l'aide d'anticorps secondaires couplés à des billes d'or de respectivement 10 et 15 nm. Les cercles rouges indiquent les endroits où les 2 types de billes colocalisent.



**Figure 43 : Dans les cellules stimulées, le t-PA lie la face externe des cellules chromaffines de façon calcium-dépendante.**

**A.** Les cellules vivantes sont maintenues au repos (R) dans du Locke N ou stimulées (S) 10 minutes avec une solution de nicotine 20  $\mu$ M en présence d'un anticorps anti-t-PA. Elles sont ensuite lavées en présence ou en absence de calcium (+EGTA) avant d'être fixées, puis incubées avec un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-488 et avec de la phalloïdine-TRITC. Les images sont acquises au microscope confocal avec les mêmes paramètres.

**B.** L'histogramme présente l'analyse semi-quantitative de l'intensité du marquage t-PA à la périphérie cellulaire  $\pm$  SEM de 4 expériences indépendantes ( $36 < n < 75$ ). \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$  (test de Mann-Whitney).

**C.** Les fractions obtenues après stimulation des cellules avec du KCl 59 mM (KCl) ou 20  $\mu$ M de nicotine (Nic) sont analysées par western-blot avec des anticorps dirigés contre l'annexine A2 et le t-PA.

membrane granulaire fusionnée.

## ii. Le t-PA colocalise avec l'annexine A2 extracellulaire

Nous avons ensuite étudié en microscopie électronique la localisation de l'annexine A2 et du t-PA extracellulaire sur des feuilletts de membrane plasmique de cellules stimulées (**Figure 42**). Nos résultats montrent que l'annexine A2 et le t-PA colocalisent sur la face externe des cellules. La proximité entre les deux types de billes pourrait refléter une interaction entre ces deux protagonistes.

Pour conforter ce résultat, nous avons recherché si la liaison du t-PA à la surface des cellules était sensible au calcium. Nous avons mené des expériences d'immunocytochimie et de biochimie. Les **figures 43 A** et **B** montrent que le marquage du t-PA disparaît après un lavage avec un tampon contenant de l'EGTA. L'analyse par western-blot des sécrétats et des éluats EGTA confirme que le t-PA est sécrété lorsque les cellules sont stimulées mais surtout qu'il est aussi présent dans l'éluat EGTA comme l'annexine A2 (**Figure 43, C**). Ces résultats montrent que du t-PA interagit avec la membrane plasmique de façon calcium-dépendante et se comporte comme l'annexine A2. Ces résultats suggèrent ainsi que l'annexine A2 extracellulaire pourrait être le co-récepteur du t-PA à la surface des cellules chromaffines.

## 3) Discussion

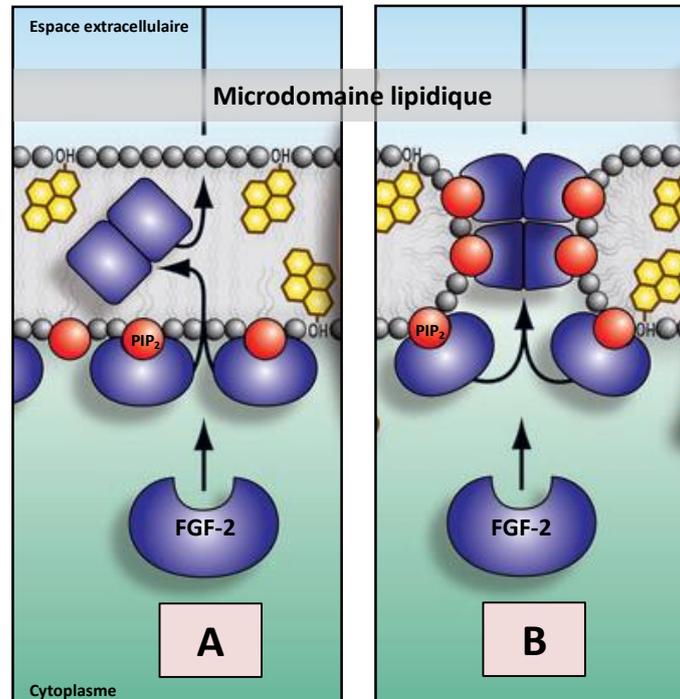
Au cours de cette étude, nous avons montré que l'annexine A2 n'est pas sécrétée dans le milieu extracellulaire par des exosomes mais qu'elle traverse la membrane plasmique et reste à la surface des cellules chromaffines stimulées. De plus, l'annexine A2 P-Tyr<sup>23</sup> est associée de façon calcium-dépendante à la face externe de la membrane plasmique. Sa présence à la surface des cellules a été décrite dans plusieurs autres types cellulaires comme dans les cellules endothéliales (Deora et al., 2004), les kératinocytes (Dziduszko et Ozburn, 2013), les neurones GABAergiques (Zhao et Lu, 2007), les cellules photoréceptrices (Valapala et al., 2014) ou encore dans les cellules cancéreuses (Diaz et al., 2004, Sharma et al., 2006). Dans la majorité de ces modèles, l'externalisation de l'annexine A2 nécessite la phosphorylation de la Tyr<sup>23</sup> (Deora et al., 2004, Valapala et al., 2014). Nous avons également mis en évidence un lien entre l'externalisation d'annexine A2 et le processus d'exocytose puisque la sortie d'annexine A2 nécessite la formation du complexe

SNARE et se fait à proximité des sites de fusion des granules de sécrétion. De plus, d'après nos résultats, l'annexine A2 extracellulaire pourrait jouer le rôle de co-récepteur du t-PA. Une question reste cependant encore sans réponse : comment traverse-t-elle la membrane plasmique ?

#### **a) Par quel mécanisme l'annexine A2 est-elle externalisée ?**

Il existe un certain nombre de protéines solubles dépourvues de peptide signal, qui sont sécrétées dans le milieu extracellulaire (Zhang et Schekman, 2013). De même, certaines protéines transmembranaires synthétisées à partir du réticulum endoplasmique rejoignent la membrane plasmique en outrepassant l'appareil de Golgi (Nickel et Seedorf, 2008, Prudovsky et al., 2008). Ces observations ont permis de mettre en évidence un type de sécrétion appelée depuis 1990 "sécrétion non conventionnelle" (Muesch et al., 1990, Zhang et Schekman, 2013). Au sein des protéines sécrétées de façon non conventionnelle, on distingue deux grandes voies : avec ou sans l'intervention de vésicules de transport (Rabouille et al., 2012).

D'après la littérature, le mécanisme de translocation de l'annexine A2 ne dépendrait pas de vésicules mais passerait plutôt par l'insertion directe de l'annexine A2 dans la bicouche lipidique suite à l'oligomérisation des lipides. Un mécanisme semblable a également été décrit pour la sécrétion non conventionnelle des facteurs de croissance de fibroblastes (FGF) (Rabouille et al., 2012). Le FGF-1 transloque à la surface des cellules sous la forme d'un complexe multiprotéique comprenant le segment p40 de la synpatotagmine-1 (LaVallee et al., 1998), la protéine S100A13 (Landriscina et al., 2001) et la sphingosine kinase 1 (Soldi et al., 2007). Ce mécanisme nécessite également du calcium et une externalisation de PS (Kirov et al., 2012). De plus, des fibres de stress sont nécessaires à l'assemblage du complexe multiprotéique au niveau de la membrane plasmique avant sa translocation (Prudovsky et al., 2002). Au vu de ces caractéristiques, il semble logique de faire le parallèle avec l'annexine A2, également sensible au calcium, capable de lier le PS ainsi que d'interagir avec le cytosquelette d'actine et avec des protéines de la famille des S100. Un tel mécanisme pourrait donc être envisageable dans les cellules chromaffines.



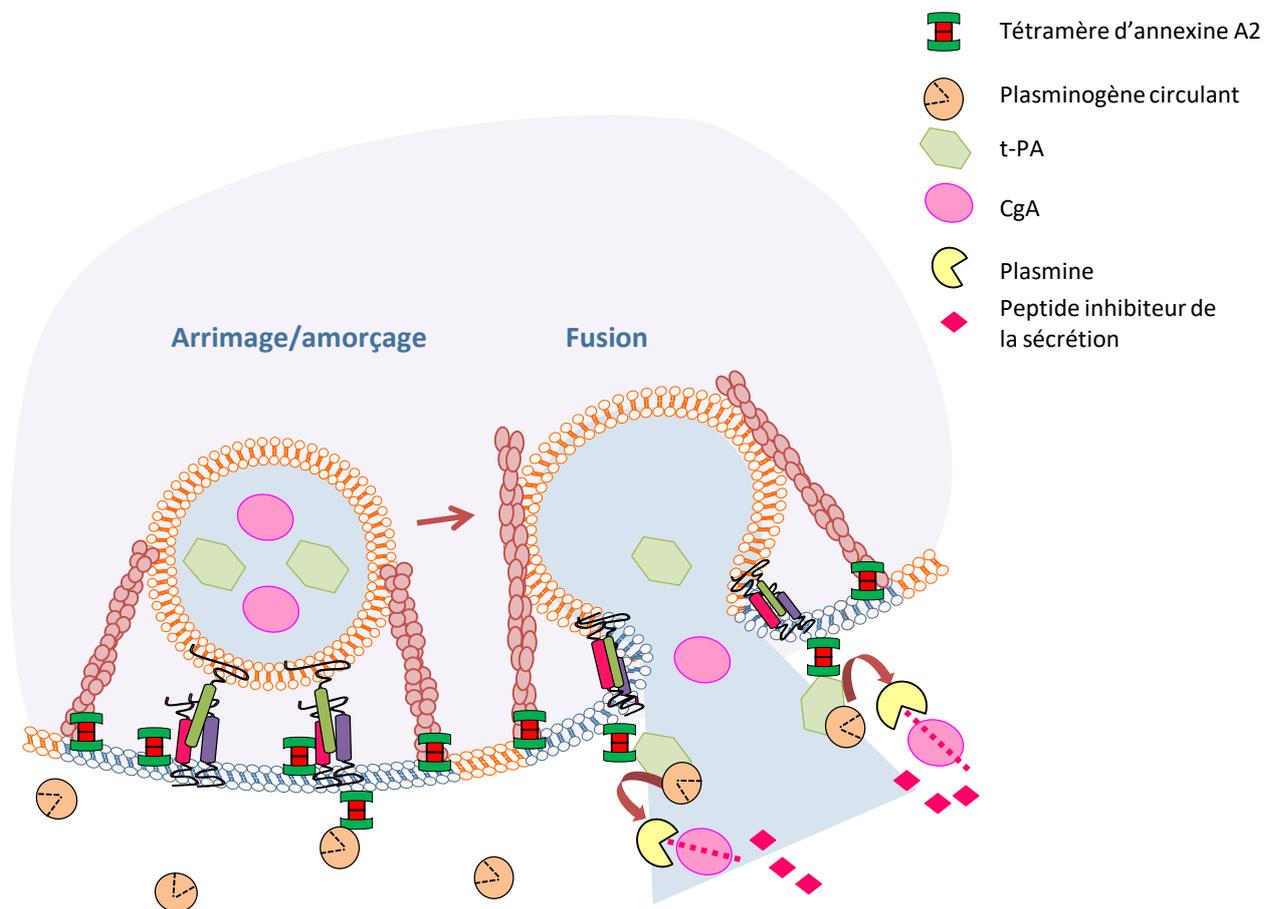
**Figure 44 : Passage du FGF-2 sur la face externe des cellules.**

Dans l'hypothèse **A**, la translocation du FGF-2 à travers la membrane dépend d'un changement conformationnel induit par le PIP<sub>2</sub>. Dans l'hypothèse **B**, la translocation du FGF-2 est basée sur la formation d'un pore hydrophile. Son ouverture est initiée au sein d'un domaine lipidique, par l'interaction de plusieurs molécules de FGF-2 avec les molécules de PIP<sub>2</sub>. C'est la courbure positive de la membrane, due à la forte concentration de PIP<sub>2</sub>, et des facteurs protéiques additionnels qui pourraient faciliter ce processus.

(D'après Nickel and Seedorf, 2008).

Sachant qu'une externalisation de PS dépendant de la PLSCR-1 a lieu au cours de l'exocytose et que l'annexine A2 lie le PS, nous avons étudié la possibilité que les deux mécanismes puissent être corrélés (Ory et al., 2013). Il apparaît que, lorsque la sortie de PS est bloquée par l'inhibition de la PLSCR-1, l'annexine A2 transloque toujours sur la face externe des cellules. La surexpression de la protéine PLSCR-1 WT ne stimule pas non plus la sortie d'annexine A2. L'externalisation de l'annexine A2 ne dépend donc pas de l'activité de la PLSCR-1, ce qui ne nous fait pas exclure le PS du mécanisme d'externalisation de l'annexine A2 pour autant. En effet, des résultats similaires ont été obtenus avec le FGF-1. Ni la surexpression, ni l'inhibition de la PLSCR-1 n'affecte la sortie de FGF-1 dans les fibroblastes mais, lorsque la sortie de PS est inhibée pharmacologiquement, l'externalisation du FGF-1 est bloquée (Kirov et al., 2012). Pour vérifier si cette hypothèse est transposable dans notre modèle, il faudra tester dans l'effet de composés chimiques inhibant la sortie de PS comme la taurine et l'isoproterenol afin de voir si l'annexine A2 est toujours externalisée (Kirov et al., 2012).

Un autre mécanisme a été proposé pour l'externalisation du FGF-2, *via* sa liaison avec le PIP<sub>2</sub>. En effet, le FGF-2 est recruté à la membrane plasmique par un mécanisme impliquant le PIP<sub>2</sub> et, lorsque le niveau de PIP<sub>2</sub> est réduit ou lorsque les fibroblastes expriment un mutant du FGF-2 incapable de lier le PIP<sub>2</sub>, l'externalisation de FGF-2 est altérée (Temmerman et al., 2008). Deux hypothèses sont proposées pour expliquer la sortie de FGF-2 (**Figure 44**). En **A**, l'interaction du FGF-2 avec le PIP<sub>2</sub> induit un changement conformationnel du FGF-2, permettant son insertion dans la membrane plasmique (Steringer et al., 2012). Ce mécanisme nécessite également la phosphorylation de la tyrosine 82 du FGF-2 et son hétérodimérisation avec la Tec kinase (Ebert et al., 2010, Steringer et al., 2012). Dans la seconde hypothèse en **B**, la sortie de FGF-2 est influencée par la courbure membranaire positive induite par la concentration de molécules de PIP<sub>2</sub>. Cet environnement hydrophile pourrait permettre la création d'un pore dans lequel le passage de FGF-2 vers l'extérieur de la membrane serait favorable (Nickel et Seedorf, 2008). Ces hypothèses peuvent facilement être transposables à l'annexine A2, d'autant plus qu'il y a formation de domaines riches en PIP<sub>2</sub> au niveau des sites d'exocytose (Umbrecht-Jenck et al., 2010).



**Figure 45 : Mode d'action de l'annexine A2 extracellulaire.**

Lors d'une stimulation, le tétramère d'annexine A2 présent à proximité des protéines SNARE est capable de traverser la membrane plasmique. Le tétramère d'annexine A2 extracellulaire capterait le plasminogène circulant et le t-PA libéré par les granules de sécrétion afin d'accélérer la génération de plasmine. La plasmine pourrait alors cliver la CgA libérée en catestatine, un peptide inhibiteur de la sécrétion. L'annexine A2 participerait donc à la régulation paracrine de la sécrétion des cellules chromaffines.

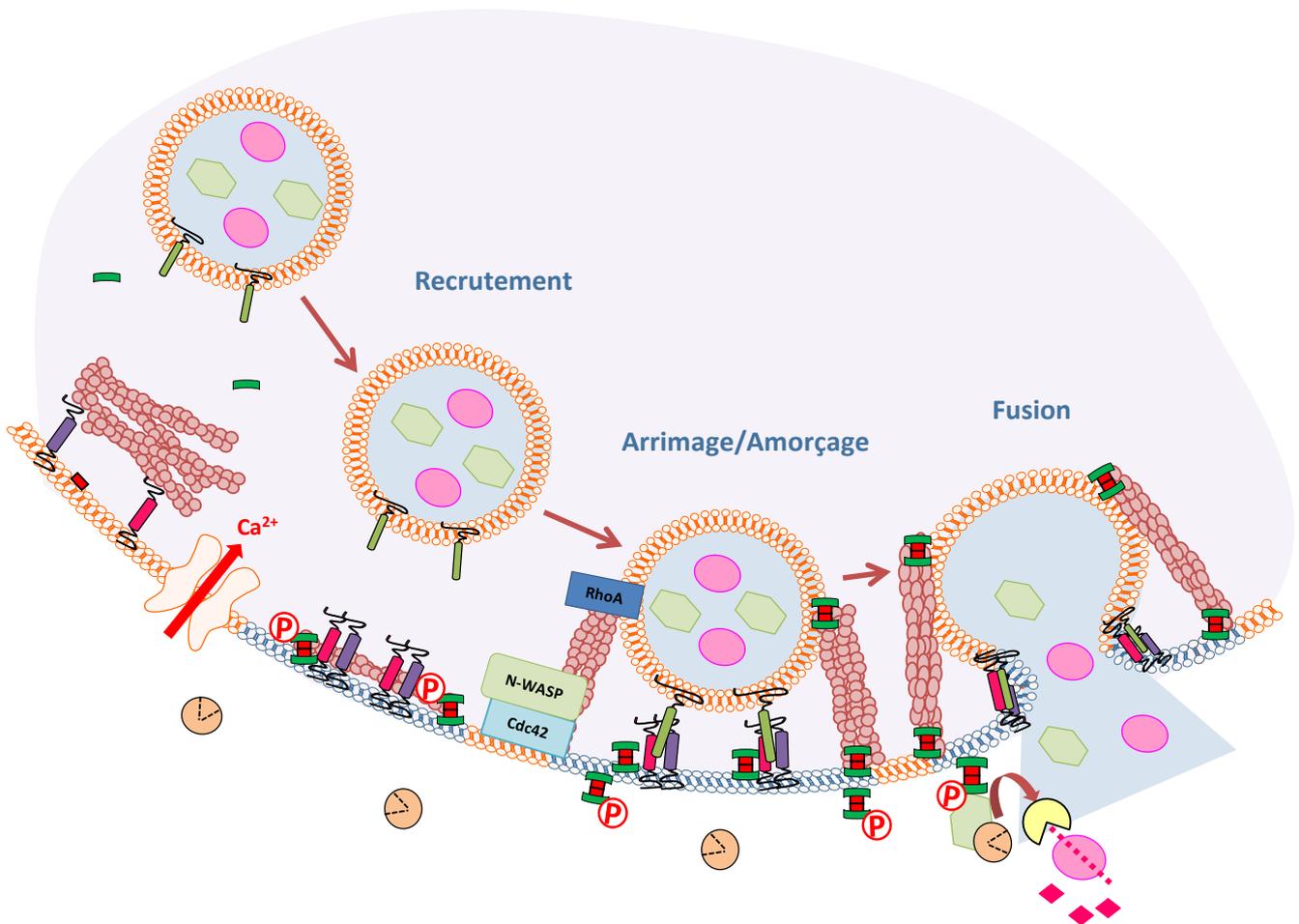
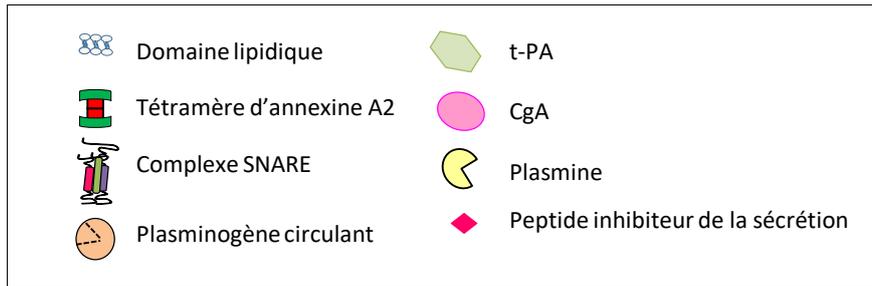
## **b) Est-ce que l'annexine A2 extracellulaire participe à la régulation paracrine de la sécrétion ?**

Le rôle le plus connu de l'annexine A2 extracellulaire est celui de co-récepteur du t-PA et du plasminogène (Kim et Hajjar, 2002). Parmer et ses collaborateurs ont montré qu'à la surface des cellules chromaffines, le plasminogène et le t-PA agissent avec des récepteurs non encore identifiés (Parmer et al., 2000). Nos résultats montrent que le t-PA et l'annexine A2 colocalisent à la surface des cellules chromaffines et qu'ils lient la membrane plasmique de façon calcium-dépendante. Nous pouvons supposer que la présence de t-PA dans l'éluat EGTA soit la conséquence de l'élution de son récepteur, l'annexine A2.

Au vu de nos résultats, nous proposons le modèle suivant (**Figure 45**). Le tétramère d'annexine A2, présent à l'extérieur des cellules au niveau du site d'exocytose, pourrait capter le t-PA libéré dans le milieu extracellulaire ainsi que le plasminogène présent à une forte concentration (2  $\mu$ M) dans l'environnement des cellules chromaffines (Parmer et al., 2000). Ces interactions provoqueraient la transformation du plasminogène en plasmine, qui pourrait alors interagir avec la CgA, également libérée à cet endroit. Sachant que la plasmine est capable de cliver la CgA en peptides inhibiteurs de la sécrétion comme la catéstatine (Mahata et al., 2000, Parmer et al., 2000), les peptides ainsi générés pourraient alors agir sur les cellules chromaffines avoisinantes et réguler leur sécrétion. Le t-PA n'est présent dans les granules de sécrétion que dans 20% des cellules chromaffines (Weiss et al., 2014b), alors que nous avons identifié du t-PA extracellulaire à la surface de toutes les cellules. L'annexine A2, en tant que co-récepteur du t-PA, participerait donc à la régulation paracrine de la sécrétion des catécholamines dans les cellules chromaffines.

# **Partie III :**

# **Conclusions et perspectives**



**Figure 46 : Modèle d'action de l'annexine A2 au cours de l'exocytose.**

Lors d'une stimulation, l'annexine A2 est recrutée à la membrane plasmique par la protéine S100A10. Elle est alors phosphorylée sur Tyr<sup>23</sup> pour former les microdomaines lipidiques à l'aide de l'actine. À cette étape, elle pourrait également recruter des GTPases impliquées dans la synthèse et la réorganisation du cytosquelette d'actine. Une partie de l'annexine A2 est ensuite déphosphorylée pour permettre l'arrimage et/ou la fusion des granules alors qu'une autre partie transloque sur la face externe des cellules chromaffines. Lors du processus de fusion, l'annexine A2 et l'actine contrôlent l'ouverture du pore de fusion et participent à l'expulsion du contenu granulaire. Le t-PA, tout comme le plasminogène circulant, est ensuite capté par l'annexine A2 extracellulaire. La génération de plasmine permet de cliver la CgA sécrétée pour libérer des peptides inhibiteurs de l'exocytose.

## Conclusions et perspectives

Mes travaux de thèse ont permis une avancée significative dans la compréhension du mode d'action de l'annexine A2 au cours du processus de sécrétion régulée. L'ensemble des mes résultats permet de proposer le modèle suivant (**Figure 46**). Dans les cellules au repos, l'annexine A2 est cytoplasmique et sous forme monomérique tandis que la protéine S100A10 est ancrée à la membrane par la protéine VAMP2. Lors d'une stimulation par un sécrétagogue, l'entrée de calcium provoque le recrutement de l'annexine A2 à la membrane plasmique par la protéine S100A10. L'annexine A2 est alors phosphorylée sur la tyrosine 23 par une tyrosine kinase qu'il reste encore à identifier. Cette phosphorylation augmente l'affinité de l'annexine A2 pour certains phospholipides comme le PA et le PS, permettant à l'annexine A2 de rassembler ces lipides pour former des radeaux lipidiques à l'aide du cytosquelette d'actine. Ces plateformes enrichies en GM1 et en PIP<sub>2</sub> sont nécessaires au bon fonctionnement des protéines SNARE et permettent le recrutement spatiotemporel des différents acteurs nécessaires au bon déroulement du processus de sécrétion (Chamberlain et al., 2001, Chasserot-Golaz et al., 2005). À cette étape, l'annexine A2 pourrait également recruter des GTPases impliquées dans la synthèse et la réorganisation du cytosquelette d'actine.

Lorsque le complexe SNARE est formé, une faible quantité d'annexine A2 P-Tyr<sup>23</sup> transloque sur la face externe alors que l'autre partie est déphosphorylée pour permettre l'arrimage des granules de sécrétion. La déphosphorylation stimule l'activité de fasciculation de l'annexine A2 et permet la création de faisceaux d'actine qui stabilisent le granule à la membrane plasmique. Lors de l'étape de fusion, l'annexine A2 et l'actine pourraient aussi générer les forces nécessaires à l'expulsion du contenu granulaire. Le t-PA libéré pourrait alors être capté par son récepteur, le tétramère d'annexine A2, entraînant la génération de plasmine qui pourrait cliver la CgA en peptides régulateurs de la sécrétion. Ainsi, l'annexine A2 pourrait non seulement participer à la mise en place des sites d'exocytose, mais aussi à la régulation paracrine de la sécrétion des cellules chromaffines.

## 1) L'Annexine A2 et le cytosquelette d'actine, deux acteurs indispensables à la mise en place des sites d'exocytose

Dans les cellules chromaffines, nous avons mis en évidence que la fasciculation de filaments d'actine par l'annexine A2 était nécessaire à la formation de domaines lipidiques et de sites d'exocytose fonctionnels (Gabel et al., 2015). Des feuillettes de membrane plasmique analysés par tomographie électronique nous ont permis de mettre en évidence la cytoarchitecture tridimensionnelle de l'actine au niveau des sites d'exocytose. Différentes structures ont pu être identifiées : des filaments d'actine parallèles à la membrane plasmique qui pourraient être impliqués dans la formation et/ou la stabilisation des domaines lipidiques, des filaments plus épais qui ancrent le granule à la membrane plasmique et des structures d'actine qui recouvrent partiellement la surface du granule et qui pourraient jouer un rôle dans l'expulsion du contenu granulaire.

Nos résultats montrent que la formation des radeaux lipidiques nécessite la fasciculation de filaments d'actine par l'annexine A2. Les faisceaux d'actine pourraient promouvoir la coalescence des domaines lipidiques et/ou limiter leur diffusion latérale. En agissant au niveau de l'organisation structurale de l'actine subplasmalemmale, l'annexine A2 participe donc au recrutement et à l'arrimage des granules à la membrane plasmique. La création d'un environnement lipidique propice à la formation du complexe SNARE favoriserait ainsi la fusion. La composition lipidique membranaire, et notamment la présence de cholestérol, module également la dynamique du pore de fusion (Cookson et al., 2013). L'annexine A2 et l'actine pourraient aussi avoir un rôle direct lors de la formation du pore de fusion. En effet, la tension membranaire favorise la formation du pore de fusion et son expansion (Monck et al., 1991, Bretou et al., 2014). Nos observations montrent une légère courbure positive sous les granules de sécrétion arrimés. La fasciculation de filaments d'actine par l'annexine A2 au niveau du site d'arrimage pourrait induire une déformation membranaire et promouvoir la mise en place et l'ouverture du pore de fusion. L'annexine A2 pourrait aussi intervenir dans la formation du pore de fusion en liant directement les lipides de type PA, PIP<sub>2</sub> ou PS. Un rôle a également été proposé pour le cytosquelette d'actine lors de la dilation du pore de fusion (Felmy, 2007). Dans les cellules non neuronales, le manteau d'actine au niveau des granules de sécrétion est impliqué dans le processus de fusion. Les

forces de contraction, exercées par l'actine et la myosine II, compressent le granule afin d'en expulser son contenu (Nightingale et al., 2012). Dans les cellules chromaffines, le manteau présent sur les granules de sécrétion et/ou les filaments permettant l'ancrage à la membrane plasmique, pourraient exercer des forces mécaniques sur le granule et favoriser la libération de son contenu. De plus, dans les cellules alvéolaires de type II, la fusion des corps lamellaires nécessite l'intervention de l' $\alpha$ -actinine (Miklavc et al., 2015). Cette protéine capable de relier les filaments d'actine entre eux, participe et régule la contraction du manteau d'actine. Localisée au niveau du manteau d'actine vésiculaire, elle pourrait également être impliquée lors du processus de fusion.

### **a) Quelle est l'origine des filaments d'actine fasciculés par l'annexine A2 ?**

L'origine des filaments d'actine fasciculés par l'annexine A2 reste encore à définir. Les filaments peuvent être des filaments résiduels de la barrière d'actine corticale ou bien des filaments nouvellement synthétisés lors de la stimulation. En effet, l'annexine A2 est capable de recruter différentes Rho GTPases impliquées dans la polymérisation de l'actine comme RhoA (Rescher et al., 2008) ou Rac1 (Hansen et al., 2002) qui peuvent être présentes dans les radeaux lipidiques (Guan, 2004). Dans les cellules épithéliales, l'annexine A2 peut aussi lier Cdc42 et recruter cette GTPase au niveau de plateformes lipidiques enrichies en PIP<sub>2</sub> (Martin-Belmonte et al., 2007). De plus, les domaines enrichis en PIP<sub>2</sub> peuvent directement servir de points d'ancrage pour les filaments d'actine au niveau de la membrane plasmique (Rescher et al., 2004, Di Paolo et De Camilli, 2006). Dans plusieurs types cellulaires, l'annexine A2 peut aussi activer Rho pour induire un réarrangement du cytosquelette d'actine (Babbin et al., 2007, Rescher et al., 2008). En recrutant différentes Rho GTPases au niveau des microdomaines, l'annexine A2 pourrait permettre la synthèse localisée de nouveaux filaments d'actine au niveau du site d'exocytose. Elle pourrait ensuite regrouper ces filaments pour stabiliser les domaines lipidiques. Afin d'identifier plus précisément quels acteurs protéiques sont impliqués dans la formation et la stabilisation de ces filaments d'actine, nous étudierons les effets de l'expression de mutants inactifs des différentes GTPases sur ces structures d'actine dans les cellules chromaffines.

La tomographie électronique a mis en évidence des structures globulaires associées à la membrane plasmique et localisées à une centaine de nanomètres des granules arrimés.

Ces structures représentent les points d'ancrage des filaments d'actine qui relient le granule à la membrane. Pour la suite de cette étude, il sera important d'identifier les partenaires protéiques de l'annexine A2 impliqués dans cet ancrage. Des immunomarquages sur des feuillettes de membrane plasmique visualisés en microscopie électronique permettront leur caractérisation. Un acteur potentiel pourrait être la protéine géante AHNAK d'environ 600 kilodaltons et qui est impliquée dans les processus de réparation membranaire et d'établissement des contacts cellulaires (Davis et al., 2014). L'AHNAK est capable d'interagir avec l'actine et d'affecter sa réorganisation corticale (Hohaus et al., 2002, Benaud et al., 2004). De plus, dans les cellules rénales, elle est recrutée par le tétramère d'annexine A2 au niveau de domaines enrichis en cholestérol situés à la membrane plasmique (Benaud et al., 2004). L'AHNAK pourrait alors stabiliser les complexes à la membrane plasmique à l'aide du cytosquelette (De Seranno et al., 2006). Un rôle actif de l'AHNAK comme le recrutement d'autres partenaires protéiques n'est cependant pas exclu (Hohaus et al., 2002, Davis et al., 2014).

Ces structures globulaires pourraient également constituer un complexe protéique de régulation d'acteurs impliqués dans le processus d'exocytose. En effet, l'annexine A6 est capable de former un complexe multiprotéique avec deux tyrosine kinases (Fyn et Pyk2) et une protéine régulatrice des GTPases (RasGAP) (Chow et al., 2000). Ces structures globulaires pourraient mettre en contact l'annexine A2 ainsi que les kinases et phosphatases responsables de sa régulation par phosphorylation.

## **b) Quelle est la cinétique de formation des domaines lipidiques et de remodelage du cytosquelette d'actine ?**

La cinétique de la réorganisation du réseau d'actine et du remodelage de la membrane plasmique reste encore à déterminer plus précisément. La visualisation de la dynamique du cytosquelette d'actine dans des cellules vivantes est possible en utilisant un peptide fluorescent, Lifeact, capable de marquer les filaments d'actine sans interférer avec leur polymérisation ou leur dépolymérisation, ni avec leurs partenaires (Riedl et al., 2008). La formation des domaines lipidiques pourra être visualisée avec une sonde ratiométrique comme le di-4-ANEPPS qui permet de mettre en évidence les radeaux lipidiques (Jin et al., 2006). Dans un premier temps, nous comparerons la cinétique de remodelage du

cytosquelette et de la membrane plasmique pour voir si l'intervention des lipides et de l'actine est séquentielle ou simultanée au cours de la formation des sites d'exocytose.

La cinétique de recrutement des différents lipides pourra être étudiée dans les cellules vivantes à l'aide de sondes peptidiques, couplées à des fluorochromes, reconnaissant les différents composants des microdomaines lipidiques (comme la CTX couplée à l'Alexa-555 qui lie le GM1 ou la sonde fluorescente TopFluor-PIP<sub>2</sub> qui reconnaît le PIP<sub>2</sub>). Nous rechercherons également si l'annexine A2 est capable d'agréger directement les lipides au sein de la membrane pour former des domaines lipidiques. Afin de mettre en évidence une interaction directe entre l'annexine A2 et les lipides, des mesures de FRET (transfert d'énergie entre molécules fluorescentes) pourront être réalisées dans les cellules vivantes. Grâce à la microscopie à onde évanescente, il sera aussi possible de suivre en parallèle, la dynamique de recrutement de l'annexine A2 couplée à la GFP et des granules de sécrétion à la membrane plasmique.

## **2) Les microdomaines lipidiques, sites d'assemblage et d'activation de la machinerie sécrétrice**

De nombreux acteurs impliqués dans le processus d'exocytose possèdent des domaines de liaison au PIP<sub>2</sub> comme la syntaxine-1, la synaptotagmine, Munc13-1, la PLD1, Arf6, CAPS...et doivent être recrutés spécifiquement au niveau du site d'exocytose lors d'une stimulation (Koch et Holt, 2012, Martin, 2015). La formation de microdomaines lipidiques pourrait permettre de regrouper spatialement et temporellement les différents acteurs du processus de sécrétion et ainsi, former une plateforme pour faciliter la transduction du signal. Par exemple, les radeaux lipidiques sont nécessaires à l'activation de la phosphatidylinositol 3-kinase car ils augmentent localement sa concentration et celle de son substrat, le PIP<sub>2</sub> (Peres et al., 2003). Les microdomaines lipidiques pourraient également être impliqués dans le processus de fusion des granules de sécrétion. De part leurs propriétés physiques, ils agissent de façon directe sur la tension et la courbure membranaire mais sont également capables d'agir de façon indirecte. En effet, la présence et l'activation de certaines protéines comme la PLD1 au sein des domaines lipidique, peut également moduler la topologie membranaire (Kim et al., 2000).

### 3) Régulation de l'annexine A2 par phosphorylation

Nous avons montré que l'annexine A2 devait être phosphorylée pour former les microdomaines lipidiques et déphosphorylée pour les étapes finales de l'exocytose, mais une question reste encore à résoudre : quelles sont la kinase et la phosphatase impliquées dans ce cycle ?

#### a) Quelle est la kinase responsable de la phosphorylation de la Tyr<sup>23</sup> de l'annexine A2 ?

L'annexine A2 est le substrat majoritaire de la kinase pp60<sup>Src</sup> (Glennay et Tack, 1985). Cette tyrosine kinase est présente sur la membrane plasmique des granules chromaffines (Parsons et Creutz, 1986) et est activée par le calcium (Zhao et al., 1992). Pp60<sup>Src</sup> ne peut cependant pas être responsable de la phosphorylation de la Tyr<sup>23</sup> de l'annexine A2 au cours de la sécrétion puisque nos expériences montrent que la phosphorylation de l'annexine A2 précède le recrutement des granules de sécrétion à la membrane plasmique. L'annexine A2 est également le substrat d'autres kinases de la famille Src comme la tyrosine kinase Lyn, qui est associée à des domaines lipidiques (Matsuda et al., 2006) ou la tyrosine kinase Fyn, sensible au calcium et présente à la membrane des cellules chromaffines (Allen et al., 1996, Spijkers-Hagelstein et al., 2013). L'utilisation d'un inhibiteur des tyrosines kinases de la famille Src, le PP2, n'inhibe pas la phosphorylation de la Tyr<sup>23</sup> de l'annexine A2. L'annexine A2 n'est donc pas régulée par pp60<sup>Src</sup>, ni par les tyrosines kinases de la famille Src au cours de la sécrétion. Ces résultats sont cohérents avec d'autres observations qui mettent en évidence que, dans les cellules chromaffines, les tyrosines kinases de la famille Src sont impliquées dans les mécanismes de formation des nouveaux filaments d'actine au moment de l'expansion du pore de fusion, correspondant à des étapes tardives et non précoces de l'exocytose (Olivares et al., 2014). Ceci semble donc en accord avec notre hypothèse selon laquelle la phosphorylation pourrait avoir lieu lors des premières étapes du processus d'exocytose et par une autre tyrosine kinase que les Src.

## Phosphatase SHP-2

Position	MGPS-DEPHOS	CKSAAP-DEPHOS	MGPS-DEPHOS+CKSAAP-DEPHOS
23	2.216(high)	-0.246(high)	0.066(high)
29	2.902(high)	-0.559(high)	0.111(high)
74	1.255(high)	-0.632(high)	-0.63(no)
108	1.255(high)	-0.516(high)	-0.541(no)
146	2.588(high)	-0.713(middle)	-0.138(middle)
150	1.51(high)	-0.693(middle)	-0.571(no)
187	0.765(middle)	-0.447(high)	-0.691(no)
198	1.078(high)	-0.797(no)	-0.83(no)
231	0.51(no)	-0.764(no)	-1.041(no)
234	2.196(high)	-0.894(no)	-0.441(no)
237	1.196(high)	-0.954(no)	-0.902(no)
268	0.118(no)	-1.189(no)	-1.531(no)
274	1.961(high)	-1.239(no)	-0.803(no)
310	0.98(high)	-0.883(no)	-0.937(no)
315	0.549(low)	-0.637(high)	-0.927(no)
316	1.725(high)	-0.531(high)	-0.356(no)
317	1.451(high)	-0.423(high)	-0.388(no)
326	2.118(high)	0.435(high)	0.549(high) ←
332	1.275(high)	0.756(high)	0.445(high) ←

**Figure 47 : Prédiction des sites de déphosphorylation de la SHP-2 dans la séquence de l'annexine A2 bovine.**

La première colonne du tableau indique la position de la tyrosine dans la séquence de l'annexine A2. Les trois autres colonnes correspondent aux trois algorithmes utilisés pour prédire les sites de déphosphorylation de la phosphatase SHP-2 (*Wang et al, 2016*). Les prédictions indiquent qu'une tyrosine peut être un site de déphosphorylation spécifique d'une phosphatase à 90% (high), 85% (middle) ou 80% (low). Le résidu peut également ne pas correspondre à un site de déphosphorylation potentiel (no).

Un autre candidat pour phosphoryler l'annexine A2 pourrait être la kinase Abl1, localisée au niveau de la membrane plasmique. Elle est capable d'interagir avec le cytosquelette d'actine et peut être activée par autophosphorylation (Van Etten et al., 1994, Plattner et al., 1999). Elle pourrait d'autant plus être impliquée au cours du processus de sécrétion puisqu'elle est capable de phosphoryler deux tyrosines de la PLSCR-1, responsable de l'externalisation de PS au cours de la sécrétion (Sun et al., 2001, Ory et al., 2013).

### **b) Quelle est la phosphatase impliquée ?**

Dans les cellules qui expriment le mutant d'annexine A2 Y23E, les microdomaines lipidiques sont formés mais moins de granules sont arrimés à la membrane plasmique. Ces résultats impliquent donc que l'annexine A2 doit être déphosphorylée après la formation des domaines lipidiques pour les étapes finales de la sécrétion. Afin de poursuivre cette étude, il serait intéressant d'identifier la phosphatase impliquée. Dans les cellules chromaffines, des complexes ayant à la fois une activité tyrosine kinase et phosphatase ont été mis en évidence au niveau de la membrane plasmique (van Hoek et al., 1997). De plus, certaines phosphatases sont préférentiellement localisées au niveau des domaines lipidiques et pourraient réguler l'annexine A2 à cette étape (Simons et Toomre, 2000). Un candidat potentiel pourrait être la SHP-2. Cette phosphatase sensible au calcium est capable d'interagir avec l'annexine A2 (Yoo et Hayman, 2007) et se situe dans le cytoplasme des cellules chromaffines. Par ailleurs, un outil informatique basé sur l'utilisation de différents algorithmes a permis d'identifier, au sein d'une séquence protéique, les sites potentiels de déphosphorylation de la phosphatase SHP-2 (Wang et al., 2016). Les trois algorithmes utilisés identifient les tyrosines 23 et 29 de l'annexine A2 comme des sites de très forte spécificité pour être déphosphorylés par la SHP-2 (**Figure 47**). Nous testerons cette hypothèse à l'aide d'anticorps dirigés contre la SHP-2 et grâce à l'utilisation d'un inhibiteur spécifique, le NSC87877 (Zhan et al., 2009).

#### 4) Importance fonctionnelle de l'annexine A2 extracellulaire dans les cellules chromaffines

Dans les cellules chromaffines, nos résultats suggèrent que l'annexine A2 extracellulaire pourrait jouer un rôle dans la régulation paracrine du processus de sécrétion en tant que co-récepteur du t-PA. Une autre hypothèse quant au rôle de l'annexine A2 à l'extérieur des cellules pourrait être son implication dans le couplage des processus d'exocytose et d'endocytose, où elle pourrait engendrer la déformation membranaire nécessaire à l'initiation du processus d'endocytose. En effet, l'annexine A2 a été identifiée comme le récepteur cellulaire de la toxine CARDS (Community-Acquired Respiratory Distress Syndrome) et est impliquée dans son processus d'internalisation cellulaire (Somarajan et al., 2014). De plus, l'internalisation du pathogène *Cryptococcus neoformans* dans les cellules hôtes est dépendante de la présence de domaines lipidiques, du remodelage du cytosquelette et de l'activité de la kinase DYRK3 (Huang et al., 2011).

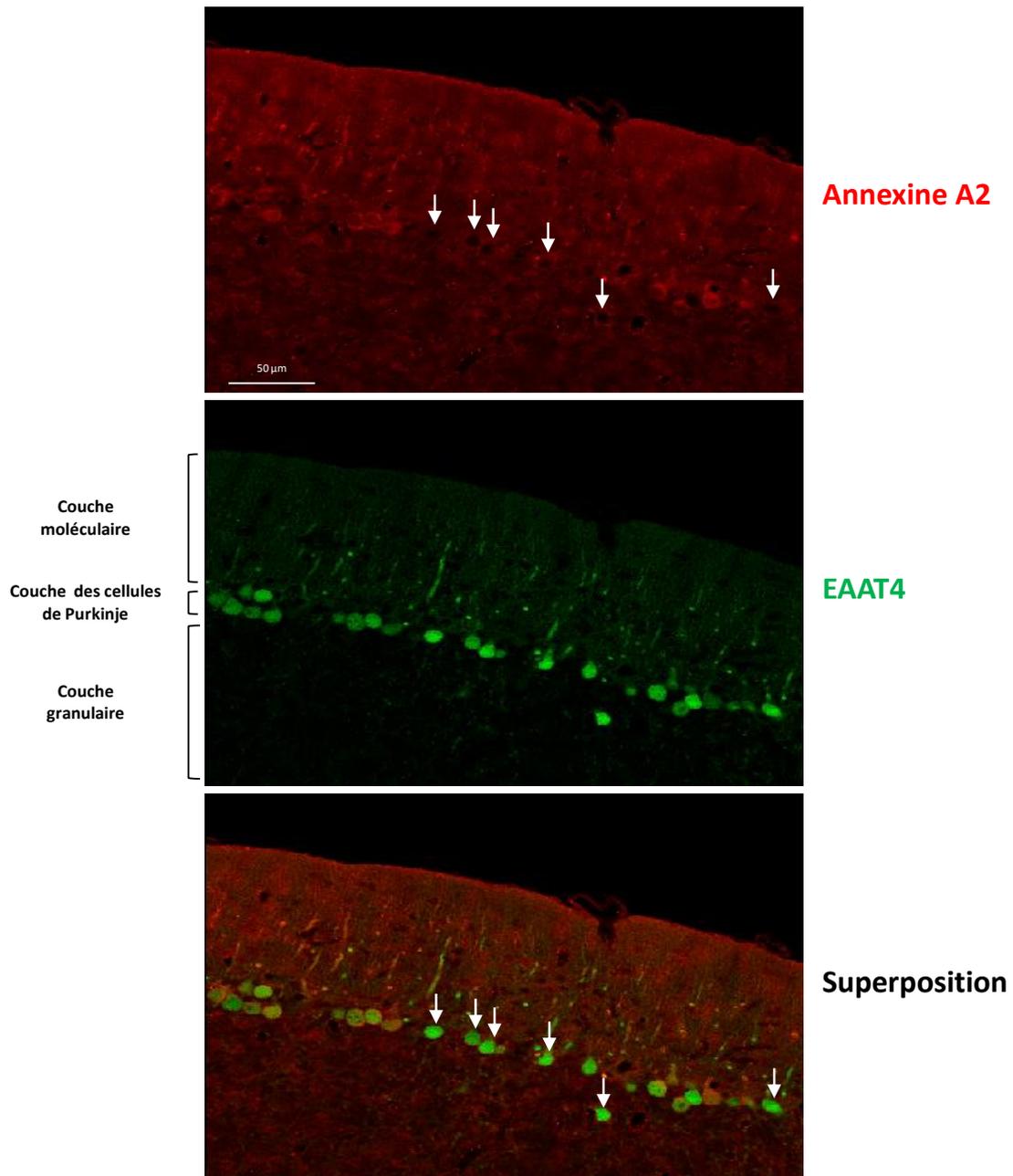
Sur la face externe des cellules chromaffines stimulées, nous avons identifié la protéine S100A4 liée de façon calcium-dépendante. Pour caractériser son interaction avec l'annexine A2, un inhibiteur de la protéine S100A4 comme le mérocyanine pourra être testé (Liu et al., 2015). Il serait intéressant d'identifier si le tétramère d'annexine A2-S100A4 est formé au cours du processus de sécrétion et d'établir quel pourrait être son rôle. Vu l'importance de l'annexine A2 extracellulaire (Siever et Erickson, 1997, Deora et al., 2004, Zhao et Lu, 2007, Valapala et Vishwanatha, 2011), élucider son mécanisme de translocation représente un enjeu majeur pour comprendre la régulation de divers processus tels que la fibrinolyse, la communication et la migration cellulaire.

## 5) L'annexine A2 joue-t-elle un rôle dans les neurones ?

Une perspective intéressante serait de transposer nos travaux sur les cellules chromaffines aux cellules neuronales et d'étudier si l'annexine A2 intervient également dans la neurotransmission. Elle pourrait par exemple jouer un rôle dans le remodelage membranaire nécessaire à la plasticité synaptique. À ce jour, l'annexine A2 a été très peu étudiée dans les neurones bien qu'elle soit présente dans différentes régions du cerveau comme au niveau du cortex cérébral et de la couche CA2 de l'hippocampe, et surtout au niveau des cônes de croissance des interneurons GABAergiques où elle colocalise avec le t-PA (Zhao et Lu, 2007). De plus, une association dynamique entre le tétramère d'annexine A2 et les microdomaines lipidiques a été mise en évidence dans les neurones au cours d'un apprentissage (Zhao et al., 2004). La présence de l'annexine A2 au niveau de ces domaines lipidiques pourrait également permettre le recrutement et/ou l'agrégation de récepteurs de neurotransmetteurs et/ou de protéines kinases pour faciliter la transduction du signal.

En effet, l'annexine A2 (Huai et al., 2012, Ning et al., 2012, Avenali et al., 2014) et la protéine S100A10 (Okuse et al., 2002, Foulkes et al., 2006) sont capables d'interagir avec plusieurs récepteurs canaux afin de réguler leur localisation à la membrane plasmique et de moduler leur activité. Considérant l'importance de l'environnement lipidique sur le fonctionnement neuronal (Head et al., 2014, Aureli et al., 2015, Taberner et al., 2015) et les rôles de S100A10 et de l'annexine A2 dans la formation des plateformes lipidiques au niveau des sites d'exocytose, il est tentant d'imaginer qu'en interagissant avec certains canaux ioniques, la S100A10 pourrait recruter l'annexine A2 pour modifier l'organisation de la membrane plasmique au niveau de ces canaux et ainsi affecter leur fonctionnement. De plus, l'implication des domaines lipidiques dans le trafic et la stabilisation de récepteurs membranaires a déjà été mise en évidence pour des récepteurs tels que le récepteur AMPA au glutamate et le récepteur nicotinique à l'acétylcholine (Hering et al., 2003, Pediconi et al., 2004).

Durant ma thèse, j'ai obtenu des résultats préliminaires quant à la localisation de l'annexine A2 dans le cervelet de souris. Dans les neurones GABAergiques du cortex cérébelleux appelés cellules de Purkinje, deux populations se distinguent : des neurones où l'annexine A2 est cytoplasmique et d'autres où elle est localisée à la périphérie cellulaire



**Figure 48 : Localisation de l'annexine A2 dans les cellules de Purkinje.**

Des tranches de cervelet de souris exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur du gène codant le EAAT4 ont été marquées avec un anticorps dirigé contre l'annexine A2 et visualisées au microscope confocal. Les flèches indiquent les cellules où le marquage d'annexine A2 est périphérique.

**(Figure 48).** Nous avons vérifié et confirmé que ces deux populations ne correspondaient pas à une compartimentalisation déjà décrite dans le cervelet, celle du transporteur EAAT4 du glutamate (Gincel et al., 2007). La signification de cette différence de localisation reste encore à être élucidée mais elle suggère que ces deux populations pourraient refléter différents états d'activation des cellules de Purkinje.

En conclusion, l'annexine A2 possède de nombreuses caractéristiques qui font d'elle une protéine aux propriétés attractives. Présente à l'intérieur comme à l'extérieur des cellules, elle joue de multiples rôles et est impliquée dans une multitude de processus. Il est donc primordial de comprendre ses différentes fonctions et les mécanismes par lesquels elle est régulée. De plus, plusieurs pathologies sont associées à un défaut de composition et d'organisation des membranes cellulaires (Rushworth et Hooper, 2010, Schengrund, 2010) ou à un défaut d'expression de l'annexine A2 (Gauthier-Kemper et al., 2011, Zhang et al., 2012, Wang et Lin, 2014). La compréhension de la régulation des domaines lipidiques par l'annexine A2 représente donc un défi majeur pour le futur. Élucider les mécanismes moléculaires à l'origine de leurs dysfonctionnements permettra de mieux comprendre le développement de certaines maladies et d'élaborer peut-être, de nouvelles stratégies thérapeutiques.

# **Matériels & méthodes**

# Matériels et méthodes

## 1) Culture cellulaire, transfection et mesure de sécrétion

### a) Culture primaire de cellules chromaffines bovines

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

Immédiatement après le sacrifice de l'animal, les glandes surrénales sont prélevées et placées dans une solution de Locke (5 mM d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES), 154 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 3,6 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5,6 mM glucose, pH 7,4), contenant de la primocine 100 µg/ml. Les glandes sont ensuite dégraissées et la veine surrénale est canulée pour permettre pendant 10 minutes la perfusion d'une solution de Locke (50 ml/glande) afin d'éliminer le plasma et les érythrocytes des vaisseaux. Puis, les glandes sont digérées par une solution de collagénase A (Locke contenant 0,4% de collagénase A et 0,5% de bovine serum albumin (BSA)), les parties corticales et médullaires sont séparées par dissection et les cellules de la médullosurrénale sont dissociées par filtration sur un tamis de 217 µm. Après 10 minutes de centrifugation à 100 g et à température ambiante, le culot est repris dans du Locke puis passé sur un tamis de 82 µm afin de dissocier les cellules plus finement. S'en suit une centrifugation de 20 minutes sans frein à 20 000 g et, à température ambiante, sur un gradient continu de densité de Percoll à 47,5% (GE Healthcare) afin d'isoler les cellules chromaffines des érythrocytes et des débris cellulaires.

Les cellules chromaffines sont ensuite collectées et lavées, avant d'être centrifugées 10 minutes à 100 g dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) contenant 4 mM de glutamine et de la primocine (100 µg/ml). Le culot est ensuite repris dans du DMEM puis les cellules sont comptées à l'aide d'une cellule de Neubauer.

Pour terminer, les cellules sontensemencées à une densité adéquate sur des lamelles de 12 mm de diamètre recouvertes de fibronectine pour l'immunocytochimie ou, dans des boîtes de Pétri pour les expériences d'ampérométrie et de biochimie, dans du DMEM contenant de la primocine (100 µg/ml), 10% de sérum de veau foetal (FCS) ainsi que des antimitotiques (10 µM de cytosine arabinoside et 10 µM de 5-fluorodéoxyuridine). Les cellules sont finalement placées dans un incubateur à 37°C, dans une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub> pendant au moins deux jours avant utilisation.

## **b) Transfection des cellules chromaffines**

La transfection est effectuée juste après l'isolement des cellules chromaffines. 7,5 millions de cellules sont centrifugées 10 minutes à 800 g puis le culot est repris dans 100 µl de milieu de transfection (Basic nucleofactor kit primary neurons, AMAXA) contenant 3 µg de plasmide. Les cellules sont soumises à un choc électrique grâce à l'électroporateur AMAXA, programme X-001. 500 µl de milieu DMEM (contenant 10% de FCS et 4 mM de glutamine) est ajouté aux cellules puis le mélange est réparti sur des lamelles de verre, préalablement recouvertes de fibronectine. Les cellules sont incubées 5h à 37°C puis 1 volume du milieu DMEM (contenant des antimitotiques et antibiotiques) est ajouté. Après une nuit d'incubation à 37°C, le milieu est remplacé par du milieu DMEM complet (10% FCS, 4 mM glutamine, antimitotiques et antibiotiques). Les cellules sont cultivées au minimum 72h avant utilisation.

## **c) Mesure de la sécrétion des catécholamines**

### **i. Libération des catécholamines**

Les cellules chromaffines sont cultivées dans des plaques 96 puits. Deux lavages de 10 minutes avec 200 µl de Locke normal (Locke N) (140 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,01 mM acide ethylene-diamino-tétraacétique (EDTA), 15 mM HEPES, 0,56 mM acide ascorbique, 11 mM glucose, pH 7,5) sont effectués. Les cellules sont ensuite stimulées durant 10 minutes par 50 µl d'une solution dépolarisante de potassium 59 mM (solution de Locke N contenant 59 mM KCl et 86,9 mM NaCl, pH 7,2) ou de nicotine 20 µM diluée dans du Locke N, ou laissées au repos dans du Locke N. À la fin de

la stimulation, 20 µl de surnageants sont prélevés et transférés dans une plaque noire 96 puits, pour le dosage des catécholamines. Les cellules sont ensuite lysées avec 20 µl de Triton X-100 à 10% durant 2 minutes, et 150 µl de Locke N sont ajoutés dans les puits. Les lysats sont ensuite prélevés et transférés dans une seconde plaque noire.

## ii. Dosage fluorimétrique des catécholamines

Cette méthode est basée sur la détection de la fluorescence émise par l'oxydation des catécholamines. Dans chaque puit, 150 µl de CH<sub>3</sub>COONa (1 M, pH 6) puis 15 µl de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (0,25%) sont ajoutés. Le CH<sub>3</sub>COONa catalyse l'oxydation de l'adrénaline en adrénochrome en présence de fer. L'adrénochrome étant instable, il ne permet pas d'effectuer le dosage quantitatif. Une seconde réaction est donc nécessaire pour le transformer en adrénolutine, en ajoutant 50 µl de NaOH (5 M) et de l'acide ascorbique (0,3 mg/ml), dans chaque puit. La fluorescence est ensuite mesurée à 430 nm avec un fluorimètre Mithras LB 940 (Berthold).

## 2) Techniques de biologie moléculaire

### a) Génération de mutants de l'annexine A2 par mutagenèse dirigée

Le vecteur d'expression pEGFP-N3 a été utilisé pour générer les mutants. Il contient la séquence codante complète de l'annexine A2 WT, insérée entre les sites de restriction *Bgl*III et *Sal*I et fusionnée en C-ter à l'eGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) ainsi qu'une cassette de résistance à la kanamycine. Il a été montré que ce type de fusion à la GFP n'affecte pas les propriétés fonctionnelles et biochimiques de l'annexine A2 (Zobiack et al., 2001). Trois mutants ont été générés à partir de ce plasmide : un mutant qui ne possède plus d'activité de fasciculation des filaments d'actine (AnxA2-K286A) et deux mutants pour la Tyr<sup>23</sup> (AnxA2-Y23A et AnxA2-Y23E). Le protocole est celui du kit QuickChange II site-directed mutagenesis (Stratagene) et les primers utilisés sont les suivants :

K286A\_F : AAGGGGACGCGAGATGCGGTCTGATCAGAATC

K286A\_R : GATTCTGATCGAGACCGCATCTCGCGTCCCCTT

Y23A\_F : CTACACCCCAAGTGCAGCTGGGTCTGTCAAAGCC

Y23A\_R : GGCTTTGACAGACCCAGCTGCACTTGGGGGTGTAG

Y23E\_F : CTACACCCCAAGTGCAGGAGGGTCTGTCAAAGCC

Y23E\_R : GGCTTTGACAGACCCTTCTGCACTTGGGGGTGTAG

Pour la réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction), la Pfu Ultra High Fidelity DNA polymérase a été utilisée, ainsi qu'un thermocycleur (Master gradient Eppendorf) selon la procédure suivante : un cycle de 30 secondes à 95°C, puis 12 cycles de 30 secondes à 95°C, 1 minute à 55°C et 8 minutes à 68°C.

Les produits d'amplification de la PCR ont ensuite été soumis à une digestion enzymatique par DpnI pendant une heure à 37°C. Cette enzyme qui digère spécifiquement les brins d'ADN parentaux méthylés (et non les molécules d'ADN néosynthétisées). Une transformation (par choc thermique) de bactéries XL1-Blue compétentes est nécessaire pour distinguer les plasmides portant la mutation. Les bactéries transformées sont étalées sur un milieu Lysogeny broth (LB) solide en présence de kanamycine et incubées une nuit à 37°C. Celles ayant poussées sur ce milieu devraient contenir les plasmides mutés : pour s'en assurer, 2 colonies sont prélevées par boîte de Pétri et l'ADN plasmidique est amplifié et purifié à l'aide du kit GeneJET plasmid miniprep (Fermentas), afin d'être séquencées.

## **b) Obtention des protéines purifiées couplées à la GST**

### **i. Clonage**

Les plasmides pEGFP-N3-annexine A2 WT ou mutés sont digérés 2 heures à 37°C successivement avec les enzymes de restriction *Bgl*I puis *Sal*I, permettant d'extraire le fragment d'annexine A2 contenu entre ces 2 sites. La totalité des fractions obtenues est déposée sur gel d'agarose puis les bandes obtenues sont excisées afin d'en extraire l'ADN. Le kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) est utilisé afin d'éliminer l'agarose. La quantité d'ADN obtenue est estimée en déposant 3 µl d'ADN sur un gel d'agarose. Une étape de ligation est ensuite nécessaire afin d'introduire le fragment d'annexine A2 WT ou muté dans le vecteur pGEX-4T1 à l'aide de l'enzyme T4 ligase (Invitrogen).

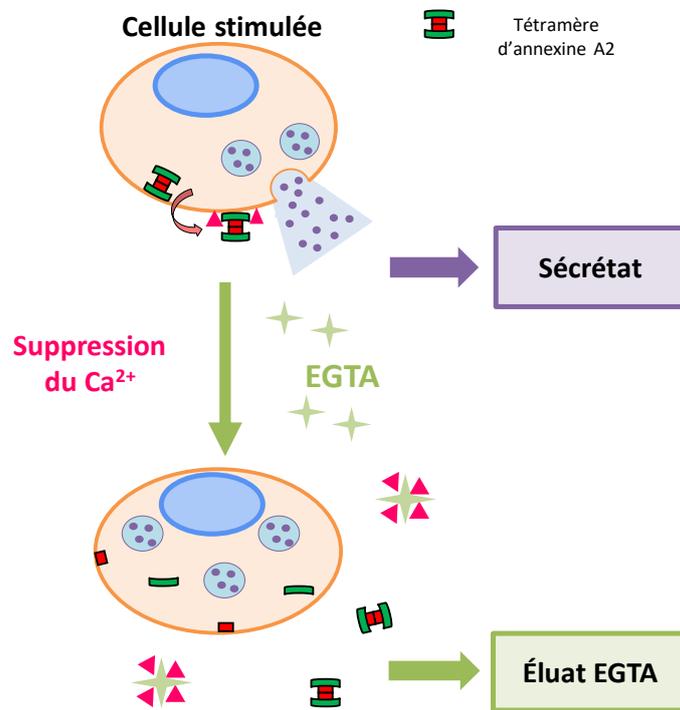
## ii. Expression et purification protéique

Des bactéries *Escherichia coli* de souche BL21 contenant les constructions d'intérêt sont cultivées dans du milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline, jusqu'à une densité optique de 0,6. L'expression des protéines fusionnées à la GST est ensuite induite avec 0,5 mM d'IPTG pendant une nuit à 30°C. Après centrifugation à 4°C pendant 10 minutes à vitesse maximale, le culot est resuspendu dans du tampon (25 mM Tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Tris), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) et des inhibiteurs de protéases (Protease Inhibitor Cocktail P8340, 500x, Sigma), puis soniqué 4 fois 10 secondes. Le lysat est centrifugé à 4°C, 20 minutes à 10000 rpm dans un rotor Sorvall SA600 et les protéines recombinantes présentes dans le surnageant sont purifiées avec des billes Glutathione-sépharose 4B (GE Healthcare) selon le protocole fourni. La production de protéine et la purification sont vérifiées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, suivie d'une coloration au bleu de Coomassie.

## 3) Techniques biochimiques

### a) Préparation de lysats cellulaires

Des boîtes de Pétri de 5 cm contenant 5 millions de cellules chromaffines sont lavées 3 fois 5 minutes avec du Locke N puis sont incubées dans du Locke N pour la condition repos ou avec du Locke N contenant 20 µM de nicotine pour la condition stimulée. Les fractions contenant les protéines sécrétées (Sécrétats) sont récupérés puis les cellules sont mises en présence de tampon de lyse (Cell extraction buffer, Invitrogen) supplémenté d'inhibiteurs de protéases (Protease Inhibitor Cocktail P8340, 500x, Sigma) et d'inhibiteurs de phosphatases (524629 Phosphatase Inhibitor Cocktail Set V, 50x, Merck Millipore). Les cellules sont ensuite placées à -80°C pendant 2 heures, grattées sur glace, puis les lysats sont soniqués 2 fois 10 secondes.



**Figure 49 : Protocole biochimique utilisé pour mettre en évidence l'annexine A2 attachée de façon calcium-dépendante à la face externe des cellules.**

Les cellules sont maintenues 5 minutes dans du Locke N pour la condition repos ou dans une solution de 20  $\mu\text{M}$  de nicotine pour la condition stimulée. La fraction contenant les protéines sécrétées (sécrétat) est récupérée puis les cellules sont placées 10 minutes dans un milieu sans calcium afin d'éluer les protéines liées de façon calcium-dépendante à la membrane plasmique (éluat EGTA). Les cellules sont ensuite lysées et les différentes fractions obtenues sont concentrées, avant d'être analysées par western-blot.

## **b) Isolation des exosomes**

Les sécrétats sont centrifugés à 100 000 g pendant 2 heures, afin d'isoler les exosomes. Les culots, contenant les exosomes, sont récupérés dans du tampon de charge et les fractions sont ensuite analysées par western blot avec des anticorps dirigés contre cd63 et RalA, des marqueurs d'exosomes.

## **c) Stimulation des cellules et externalisation de l'annexine A2**

Des boîtes de Pétri de 10 cm contenant 10 millions de cellules chromaffines sont lavées 3 fois dans du Locke N pendant 10 minutes, puis avec du Locke sans calcium (140 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM acide ethylene glycol-tétraacétique (EGTA), 15 mM HEPES, 0,56 mM acide ascorbique, 11 mM glucose, pH 7,5) afin de décrocher les protéines aspécifiques liées à la membrane de façon calcium-dépendante.

Les cellules sont ensuite incubées 5 minutes avec du Locke N pour la condition repos ou stimulées avec une solution dépolarisante de KCl 59 mM ou avec 20 µM de nicotine puis, les sécrétats sont récupérés (**Figure 49**). Les cellules sont ensuite incubées avec du Locke sans calcium pendant 10 minutes et les fractions éluats EGTA sont récupérés puis les cellules sont lysées sur glace avec 500 µl de tampon de lyse (Cell Extraction Buffer, Invitrogen) contenant des inhibiteurs de protéases (Protease Inhibitor Cocktail P8340, Sigma). Les lysats sont soniqués et, les sécrétats et éluats EGTA sont concentrés par centrifugation à l'aide de filtre concentrateur (Spin-X UF) afin d'obtenir un volume final de 50 µl.

## **d) Dosage de l'activité LDH**

La LDH est une enzyme cytoplasmique responsable de la conversion du pyruvate en lactate. En cas de lyse cellulaire, l'activité de la LDH est augmentée dans le milieu extracellulaire, ce qui permet de l'utiliser comme marqueur de lyse cellulaire.

L'activité de la LDH est déterminée par un dosage colorimétrique avec le kit QuantiChrom™ LDH (DLDH-100). La quantification de l'activité prend en compte la réduction du sel de tétrazolium (MTT) par la LDH en présence de Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydride (NADH). La forme réduite du MTT présente un maximum d'absorption

à 565nm. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un fluorimètre (Mithras LB 940, Berthold) et deux mesures sont réalisées à 25 minutes d'intervalle (temps  $t_0$  et  $t_{25}$ ).

L'activité LDH est donnée par la formule suivante :

$$\text{Activité LDH} = 43.68 \times \frac{\text{OD}_{t25} - \text{OD}_{t0}}{\text{OD}_{\text{cal}} - \text{OD}_{\text{H}_2\text{O}}} \text{ (U.L-1)}$$

### e) **Electrophorèse, électrotransfert et immunodétection (western-blot)**

La première étape consiste en une **électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes**. Le sodium dodecyl sulfate (SDS) contenu dans la partie de concentration du gel est un détergeant qui a la particularité de se lier aux protéines et de leur attribuer une charge nette négative. Sous l'influx d'un courant électrique, les protéines vont donc migrer sur le gel uniquement en fonction de leur taille. La distance de migration d'une protéine sera proportionnelle à son poids moléculaire.

L'électrophorèse est réalisée sur un gel en gradient continu de 4 à 12% d'acrylamide (Novex, NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel) ou un gel d'acrylamide 10% (Bio-Rad, Criterion™ TGX™). Les échantillons sont mélangés au tampon de charge (0,3M Tris HCl, 5% SDS, 50% glycérol, 100 mM 1,4 DTT (Dithiothréitol)) puis dénaturés par chauffage 5 minutes à 95°C. Les échantillons sont ensuite déposés sur le gel et la migration s'effectue à 200V pendant 45 minutes dans un tampon de migration (MES SDS Running Buffer (20x), Novex ou 10x Tris/Glycine/SDS, Biorad).

**L'électrotransfert** s'effectue ensuite à l'aide du Trans-blot® Turbo™ System (Bio-Rad). Il est qualifié de "demi-sec" et permet aux protéines d'être transférées sur une membrane de nitrocellulose, grâce à un courant électrique. Dans une cassette (où la base est une cathode et le couvercle une anode), le gel est déposé sur une membrane de nitrocellulose, le tout placé entre des éponges imbibées de tampon (kit Bio-Rad, 0,2 µm nitrocellulose). Un courant de 2,5A est appliqué pendant 7 minutes et permet aux protéines chargées du gel de migrer vers la membrane, tout en conservant leur organisation relative.

Pour **l'immunodétection**, après saturation des sites aspécifiques des protéines avec une solution de blocage (TBS (Tris Buffer Saline), 5% lait, 0,1% Tween-20), la membrane est incubée avec l'anticorps primaire spécifique, dirigé contre la protéine cible (une heure à

température ambiante ou une nuit à 4°C). Après 6 lavages de 5 minutes avec la solution de blocage, la membrane est hybridée une heure avec l'anticorps secondaire couplé à l'HRP (peroxydase de raifort) et l'excès est enlevé avec 6 lavages de 5 minutes avec la solution de blocage. La protéine cible est ensuite révélée par chimiluminescence en fournissant à l'HRP son substrat (Super Signal® West Femto, Thermo Scientific). La réaction d'oxydoréduction qui a lieu entraîne l'émission de photons par le luminol, un composé fluorescent. Le signal peut ensuite être détecté *via* le système d'acquisition d'images par chimiluminescence Chemi-smart 5000 ou *via* une développeuse lorsque l'intensité du signal est très faible.

## **f) Caractérisation *in vitro* de la liaison de l'annexine A2-GST aux lipides**

### **i. Préparation des liposomes**

Tous les lipides utilisés (Avanti Polar Lipids) ont été conservés en solution dans du chloroforme à -20°C. La composition des liposomes utilisés est la suivante : 65% DOPC, 20% cholestérol et 10% du phospholipide étudié (PA, PIP<sub>2</sub> ou PS). Pour pouvoir quantifier les liposomes liés aux billes par mesure de la fluorescence, 5% d'un lipide fluorescent, PENBD a été ajouté au mélange. Le chloroforme a été évaporé sous azote. Durant ce processus, le tube doit subir une rotation lente et régulière afin qu'un film opaque se forme le long des parois du tube. Le film lipidique a ensuite été séché 2 heures dans un lyophilisateur puis solubilisé dans du tampon LBB (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4). Une suspension de larges vésicules multilamellaires et hétérogènes en taille est alors obtenue. La suspension subit ensuite trois cycles de congélation (à -80°C) et de décongélation (à 37°C). Lors de l'extrusion, un système de seringues sous pression permet de faire passer la suspension de liposomes à travers une grille de polycarbonate formée de maille (0,2 µm). Une fois extrudés, les liposomes sont stables au moins 48 heures et sont conservés à 4°C.

### **ii. Estimation de la taille des liposomes par diffusion dynamique de la lumière**

La taille des liposomes a été estimée par diffusion dynamique de la lumière (DLS) à l'aide d'un Zetasizer NanoS (Malvern Instruments), équipé d'un laser de 4 mW. Cette méthode permet de mesurer la taille et la distribution de la taille des liposomes. Lorsque que la lumière du laser atteint les liposomes, la lumière diffuse dans toutes les directions.

Mesurée à un angle donné, l'intensité totale permet d'avoir des informations sur la vitesse de mouvement des particules. Les grosses particules (moins mobiles) ont une intensité qui varie moins vite au cours du temps par rapport aux plus petites molécules. Les liposomes ont été dilués au 100<sup>ème</sup> dans du tampon LBB et analysés à 20°C. 10 prises de 14 mesures sont effectuées pour chaque échantillon.

### iii. Test de liaison des protéines recombinantes aux liposomes

10 µg de protéines recombinantes couplées à des billes d'agarose ont été incubées pendant 20 minutes à température ambiante avec 10 fois plus de moles de liposomes, dans du tampon LLB contenant ou non 50µM de calcium et dans un volume final de 200 µl. Les billes couplées aux protéines sont ensuite lavées trois fois dans du LBB à 4°C et à 4900 rcf afin d'éliminer les liposomes qui n'ont pas été liés. La fluorescence des différents liposomes marqués au NBD est mesurée par fluorimétrie à 535 nm (Mithras LB 940 Berthold).

## 4) Techniques de microscopie

### a) Immunomarquages et microscopie optique

#### i. Immunomarquages

Cette technique est utilisée pour déterminer la localisation subcellulaire d'une protéine. Un anticorps couplé à un fluorochrome est dirigé contre la molécule d'intérêt et, grâce à l'émission de fluorescence, il est possible de la localiser à l'aide d'un microscope à fluorescence.

Sur une plaque chauffante à 37°C, après avoir été lavées 3 fois dans du Locke N, les cellules vivantes sont incubées dans du Locke N pour la condition repos ou dans une solution de nicotine de 20 µM pour la condition stimulée. Les cellules transfectées sont elles, stimulées avec une solution de KCl 59 mM. Si un marquage extracellulaire est réalisé, les cellules sont incubées en présence des anticorps pendant 10 minutes puis lavées rapidement avec du Locke N avant d'être fixées dans du PBS (20 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4,95 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,9% NaCl, pH 7,5), contenant 4% de paraformaldéhyde (PFA) à température ambiante. Quand un

marquage intracellulaire est réalisé, les cellules sont perméabilisées 10 minutes dans du PBS contenant 4% de PFA et 0,1% de Triton X-100. Après 6 lavages de 5 minutes dans du PBS, les cellules sont saturées 2 heures à 37°C ou une nuit à 4°C dans une solution de PBS contenant 3% de BSA et 10% de sérum de chèvre. Après 6 lavages avec du PBS, les cellules sont incubées une heure à 37°C avec les anticorps secondaires couplés aux différents fluorochromes (Alexa-488, Alexa-555 ou Alexa-647). Les lamelles sont ensuite lavées 6 fois 5 minutes puis les filaments d'actine peuvent être révélés grâce à la phalloïdine-TRITC (tétraméthylrhodamine B isothiocyanate) (Sigma) diluée 2000 fois, en incubant les cellules 20 minutes à l'obscurité. Les cellules sont ensuite lavées 6 fois 5 minutes dans du PBS, rapidement rincées à l'eau, séchées puis montées sur une lame dans un milieu de montage adapté à l'observation en microscopie confocale, le milieu Elvanol-Mowiol (Mowiol 4-88, France Biochem 85).

## **ii. Microscopie confocale**

Les lamelles sont observées avec le microscope confocal à balayage laser (Leica TCS SP5 II). Ce microscope optique permet d'effectuer des coupes virtuelles jusqu'à 0,2  $\mu\text{m}$  d'épaisseur dans l'échantillon observé et enregistre uniquement la fluorescence émise dans un plan. La fluorescence parasite des plans focaux supérieurs et inférieurs est donc éliminée.

Après acquisition des images, une analyse semi-quantitative de la fluorescence a été réalisée avec le logiciel Icy. Afin de pouvoir comparer différentes conditions, toutes les images ont été acquises avec les mêmes paramètres. Pour quantifier les marquages extracellulaires, la quantité moyenne de la fluorescence normalisée par la surface (correspond à la périphérie cellulaire) a été déterminée pour chaque cellule. L'intensité moyenne d'un marquage est ensuite comparée pour chaque condition.

## **b) Feuillettes membranaires, microscopie électronique et analyses statistiques**

Cette technique permet de visualiser à l'échelle ultrastructurale la face interne ou externe de la membrane plasmique d'une cellule ainsi que les organites et molécules qui y sont rattachés. Elle permet notamment d'observer l'organisation latérale de la membrane en nanodomains et en microdomains lipidiques. De plus, des analyses statistiques

permettent de quantifier la formation d'agrégats de molécules et de déterminer avec précision des colocalisations.

**i. Préparation des feuillets de membrane plasmique et observation en microscopie électronique à transmission.**

Pour la préparation de feuillets de membrane plasmique, des grilles de microscopie électronique en nickel recouvertes de Formvar et fixées sur des lamelles de verre sont appliquées sur des cellules chromaffines mises en culture sur des lamelles de verre recouvertes de fibronectine. Ces cellules sont préalablement stimulées ou non avec une solution de nicotine de 20  $\mu\text{M}$ . Lorsque l'expérience le requiert, des marquages sont réalisés pendant la stimulation. Une forte pression est ensuite appliquée sur les grilles à l'aide d'un bouchon de liège pendant 25 secondes. Les grilles sont ensuite retirées, arrachant des fragments de la membrane plasmique des cellules qui y adhèrent. Des feuillets de membrane plasmique dont la face cytoplasmique se trouve vers le haut sont ainsi obtenus. L'ensemble du processus est réalisé en moins de 30 secondes. Les feuillets sont ensuite fixés dans 2% de PFA pendant 10 minutes à 4°C. Après saturation des sites aspécifiques avec du PBS contenant 0,5% de BSA, 0,5% de BSA acétylée, des immunomarquages sont réalisés avec des anticorps secondaires ou avec la streptavidine, couplés à des billes d'or colloïdal de différentes tailles. Après fixation au glutaraldéhyde 2,5% dans du PBS, les échantillons sont post-fixés avec 1% de tétroxyde d'osmium ( $\text{OsO}_4$ ), déshydratés à l'éthanol par plusieurs bains de degrés alcooliques croissants, traités à l'hexaméthylsilazane et séchés à l'air. Les observations sont réalisées grâce à un microscope électronique à transmission Hitachi 7500. Pour chaque condition, environ 50 images correspondant à 50  $\mu\text{m}^2$  de membrane plasmique ont été analysées (Wilson et al., 2004). Les granules arrimés ont été comptés aléatoirement sur ces zones de 50  $\mu\text{m}^2$  de feuillets de membrane plasmique ( $25 < n < 50$ ).

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

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

La fonction K univariée de Ripley utilise ces coordonnées pour déterminer si les billes d'or sont organisées en agrégats, dispersées ou réparties aléatoirement. La fonction  $K(r)$  est définie comme suit :  $K(r) = N(r)/\lambda$  ou  $N(r)$  est le nombre de voisins à une distance inférieure à  $r$ , et  $\lambda$  est l'intensité du nuage de points, c'est à dire le nombre de points par unité de surface. Pour une distribution aléatoire, on a  $K(r) = \pi r^2$ , alors que si  $K(r) > \pi r^2$ , les particules ont plus de voisins que prévu par la distribution aléatoire c'est à dire qu'elles forment des agrégats. La fonction peut être linéarisée et on définit  $L(r) = \sqrt{K(r)/\pi}$  avec un intervalle de confiance de  $99\% \pm 1$ . Dans ces conditions,  $-1 < L(r) - r < 1$  si la distribution est aléatoire, et  $L(r) - r > 1$  si les particules forment des agrégats.

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

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

## 5) Ampérométrie à fibre de carbone

L'ampérométrie est une technique qui permet d'enregistrer les événements d'exocytose sur cellule unique. Les cellules chromaffines sont transfectées avec l'annexine A2 WT-GFP ou les mutants d'annexine A2-GFP. Les électrodes utilisées pour les enregistrements ampérométriques sont commerciales (CFE-1, ALA Scientific Instruments) et possèdent un diamètre de  $5 \mu\text{m}$ . Au début de chaque expérience, les électrodes sont soigneusement coupées sous une lampe binoculaire. 48 heures après la culture primaire, les cellules sont lavées avec une solution de Locke N puis soumises à des enregistrements ampérométriques. La fibre de carbone commerciale (ALA scientific instruments) est soumise

à un potentiel imposé de +650mV (permettant l'oxydation des catécholamines libérées), en comparaison à une électrode de référence (Ag/AgCl), puis est approchée au contact de la cellule à enregistrer. La sécrétion de catécholamines est induite par un jet d'une solution dépolarisante de potassium 59 mM pendant 10 secondes, à partir d'une micropipette placée à environ 10  $\mu\text{m}$  de la cellule enregistrée pendant 60 secondes. L'acquisition des signaux ampérométriques se fait à l'aide d'un amplificateur AMU130 (Radiometer Analytical) : ils sont échantillonnés à 5 kHz et filtrés numériquement à 1 kHz (Low-Pass filter). L'analyse des tracés ampérométriques est réalisée comme décrit précédemment par Morsharov et Sulzer (Morsharov et Sulzer, 2005) à l'aide d'une macro (obtenue par le laboratoire du Dr. R. Borges : <http://webpages.ill.es/users/rborges/>) écrite pour le logiciel Igor (Wavemetrics) et permettant la détection automatique des pics, ainsi que l'extraction des paramètres des pics. L'analyse des paramètres des pics ampérométriques est réalisée à l'aide d'une macro pour le logiciel Igor, réalisé par les Drs. S. Houy et A. Valera. Les pics supérieurs à 5 pA sont pris en compte dans l'analyse de leurs paramètres. Les pics superposés sont supprimés de l'analyse des paramètres quantique et cinétique mais sont inclus dans l'analyse de fréquence. Les pics ampérométriques supérieurs à 5 pA sont pris en compte dans l'analyse de fréquence. Les pics ampérométriques supérieurs à 2 pA sont pris en compte pour l'analyse de leurs paramètres. Les paramètres de pics sont normalisés par rapport à la moyenne des cellules contrôles pour chaque culture. Les analyses statistiques effectuées pour les comparaisons de chaque paramètre sont des tests non-paramétriques Mann-Whitney.

# **Bibliographie**

## Bibliographie

### A

- Ahnert-Hilger G, Bigalke H (Molecular aspects of tetanus and botulinum neurotoxin poisoning. *Progress in neurobiology* 46:83-96.1995).
- Ali SM, Geisow MJ, Burgoyne RD (A role for calpactin in calcium-dependent exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Nature* 340:313-315.1989).
- Allen CM, Ely CM, Juaneza MA, Parsons SJ (Activation of Fyn tyrosine kinase upon secretagogue stimulation of bovine chromaffin cells. *J Neurosci Res* 44:421-429.1996).
- Ammar MR, Kassas N, Chasserot-Golaz S, Bader MF, Vitale N (Lipids in Regulated Exocytosis: What are They Doing? *Front Endocrinol (Lausanne)* 4:125.2013).
- Aoyagi K, Sugaya T, Umeda M, Yamamoto S, Terakawa S, Takahashi M (The activation of exocytotic sites by the formation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate microdomains at syntaxin clusters. *The Journal of biological chemistry* 280:17346-17352.2005).
- Apps DK (Membrane and soluble proteins of adrenal chromaffin granules. *Semin Cell Dev Biol* 8:121-131.1997).
- Arosio D, Vrasidas I, Valentini P, Liskamp RM, Pieters RJ, Bernardi A (Synthesis and cholera toxin binding properties of multivalent GM1 mimics. *Org Biomol Chem* 2:2113-2124.2004).
- Aunis D, Bader MF (The cytoskeleton as a barrier to exocytosis in secretory cells. *J Exp Biol* 139:253-266.1988).
- Aunis D, Langley K (Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Acta Physiol Scand* 167:89-97.1999).
- Aureli M, Grassi S, Prioni S, Sonnino S, Prinetti A (Lipid membrane domains in the brain. *Biochim Biophys Acta* 1851:1006-1016.2015).
- Avenali L, Narayanan P, Rouwette T, Cervellini I, Sereda M, Gomez-Varela D, Schmidt M (Annexin A2 regulates TRPA1-dependent nociception. *J Neurosci* 34:14506-14516.2014).
- Ayala-Sanmartin J, Henry JP, Pradel LA (Cholesterol regulates membrane binding and aggregation by annexin 2 at submicromolar Ca(2+) concentration. *Biochim Biophys Acta* 1510:18-28.2001).

### B

- Babbin BA, Parkos CA, Mandell KJ, Winfree LM, Laur O, Ivanov AI, Nusrat A (Annexin 2 regulates intestinal epithelial cell spreading and wound closure through Rho-related signaling. *Am J Pathol* 170:951-966.2007).
- Babiychuk EB, Draeger A (Annexins in cell membrane dynamics. Ca(2+)-regulated association of lipid microdomains. *J Cell Biol* 150:1113-1124.2000).

- Babiychuk EB, Palstra RJ, Schaller J, Kampfer U, Draeger A (Annexin VI participates in the formation of a reversible, membrane-cytoskeleton complex in smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 274:35191-35195.1999).
- Bader MF, Doussau F, Chasserot-Golaz S, Vitale N, Gasman S (Coupling actin and membrane dynamics during calcium-regulated exocytosis: a role for Rho and ARF GTPases. *Biochim Biophys Acta* 1742:37-49.2004).
- Bader MF, Holz RW, Kumakura K, Vitale N (Exocytosis: the chromaffin cell as a model system. *Ann N Y Acad Sci* 971:178-183.2002).
- Bader MF, Thierse D, Aunis D, Ahnert-Hilger G, Gratzl M (Characterization of hormone and protein release from alpha-toxin-permeabilized chromaffin cells in primary culture. *J Biol Chem* 261:5777-5783.1986).
- Bader MF, Vitale N (Phospholipase D in calcium-regulated exocytosis: lessons from chromaffin cells. *Biochim Biophys Acta* 1791:936-941.2009).
- Barclay JW, Morgan A, Burgoyne RD (Calcium-dependent regulation of exocytosis. *Cell Calcium* 38:343-353.2005).
- Bargagna-Mohan P, Hamza A, Kim YE, Khuan Abby Ho Y, Mor-Vaknin N, Wendschlag N, Liu J, Evans RM, Markovitz DM, Zhan CG, Kim KB, Mohan R (The tumor inhibitor and antiangiogenic agent withaferin A targets the intermediate filament protein vimentin. *Chemistry & biology* 14:623-634.2007).
- Becherer U, Rettig J (Vesicle pools, docking, priming, and release. *Cell Tissue Res* 326:393-407.2006).
- Bellagamba C, Hubaishy I, Bjorge JD, Fitzpatrick SL, Fujita DJ, Waisman DM (Tyrosine phosphorylation of annexin II tetramer is stimulated by membrane binding. *J Biol Chem* 272:3195-3199.1997).
- Benaud C, Gentil BJ, Assard N, Court M, Garin J, Delphin C, Baudier J (AHNAK interaction with the annexin 2/S100A10 complex regulates cell membrane cytoarchitecture. *J Cell Biol* 164:133-144.2004).
- Berberian K, Torres AJ, Fang Q, Kisler K, Lindau M (F-actin and myosin II accelerate catecholamine release from chromaffin granules. *J Neurosci* 29:863-870.2009).
- Berendes R, Burger A, Voges D, Demange P, Huber R (Calcium influx through annexin V ion channels into large unilamellar vesicles measured with fura-2. *FEBS Lett* 317:131-134.1993).
- Bernstein BW, DeWit M, Bamburg JR (Actin disassembles reversibly during electrically induced recycling of synaptic vesicles in cultured neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 53:236-251.1998).
- Betz A, Okamoto M, Benseler F, Brose N (Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin. *The Journal of biological chemistry* 272:2520-2526.1997).
- Betz A, Thakur P, Junge HJ, Ashery U, Rhee JS, Scheuss V, Rosenmund C, Rettig J, Brose N (Functional interaction of the active zone proteins Munc13-1 and RIM1 in synaptic vesicle priming. *Neuron* 30:183-196.2001).
- Bharadwaj A, Bydoun M, Holloway R, Waisman D (Annexin A2 heterotetramer: structure and function. *Int J Mol Sci* 14:6259-6305.2013).
- Biener Y, Feinstein R, Mayak M, Kaburagi Y, Kadowaki T, Zick Y (Annexin II is a novel player in insulin signal transduction. Possible association between annexin II phosphorylation and insulin receptor internalization. *J Biol Chem* 271:29489-29496.1996).

- Borthwick LA, McGaw J, Conner G, Taylor CJ, Gerke V, Mehta A, Robson L, Muimo R (The formation of the cAMP/protein kinase A-dependent annexin 2-S100A10 complex with cystic fibrosis conductance regulator protein (CFTR) regulates CFTR channel function. *Mol Biol Cell* 18:3388-3397.2007).
- Brandherm I, Disse J, Zeuschner D, Gerke V (cAMP-induced secretion of endothelial von Willebrand factor is regulated by a phosphorylation/dephosphorylation switch in annexin A2. *Blood* 122:1042-1051.2013).
- Bretou M, Jouannot O, Fanget I, Pierobon P, Larochette N, Gestraud P, Guillon M, Emiliani V, Gasman S, Desnos C, Lennon-Dumenil AM, Darchen F (Cdc42 controls the dilation of the exocytotic fusion pore by regulating membrane tension. *Mol Biol Cell* 25:3195-3209.2014).
- Brown SS (Cooperation between microtubule- and actin-based motor proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:63-80.1999).
- Bulbring E, Tomita T (Catecholamine action on smooth muscle. *Pharmacological reviews* 39:49-96.1987).
- Burgoyne RD, Morgan A (Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev* 83:581-632.2003).

## C

- Calabresi P, Napolitano M, Centonze D, Marfia GA, Gubellini P, Teule MA, Berretta N, Bernardi G, Frati L, Tolu M, Gulino A (Tissue plasminogen activator controls multiple forms of synaptic plasticity and memory. *Eur J Neurosci* 12:1002-1012.2000).
- Caron D, Boutchueng-Djidjou M, Tanguay RM, Faure RL (Annexin A2 is SUMOylated on its N-terminal domain: regulation by insulin. *FEBS letters* 589:985-991.2015).
- Ceridono M, Ory S, Momboisse F, Chasserot-Golaz S, Houy S, Calco V, Haeberle AM, Demais V, Bailly Y, Bader MF, Gasman S (Selective recapture of secretory granule components after full collapse exocytosis in neuroendocrine chromaffin cells. *Traffic* 12:72-88.2011).
- Cesarman GM, Guevara CA, Hajjar KA (An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator (t-PA). II. Annexin II-mediated enhancement of t-PA-dependent plasminogen activation. *The Journal of biological chemistry* 269:21198-21203.1994).
- Chamberlain LH, Burgoyne RD, Gould GW (SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:5619-5624.2001).
- Chan SA, Doreian B, Smith C (Dynamin and myosin regulate differential exocytosis from mouse adrenal chromaffin cells. *Cell Mol Neurobiol* 30:1351-1357.2010).
- Chasserot-Golaz S, Coorssen JR, Meunier FA, Vitale N (Lipid dynamics in exocytosis. *Cell Mol Neurobiol* 30:1335-1342.2010).
- Chasserot-Golaz S, Vitale N, Sagot I, Delouche B, Dirrig S, Pradel LA, Henry JP, Aunis D, Bader MF (Annexin II in exocytosis: catecholamine secretion requires the translocation of p36 to the subplasmalemmal region in chromaffin cells. *J Cell Biol* 133:1217-1236.1996).
- Chasserot-Golaz S, Vitale N, Umbrecht-Jenck E, Knight D, Gerke V, Bader MF (Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Mol Biol Cell* 16:1108-1119.2005).

- Cheek TR, Burgoyne RD (Nicotine-evoked disassembly of cortical actin filaments in adrenal chromaffin cells. *FEBS letters* 207:110-114.1986).
- Chieriegatti E, Meldolesi J (Regulated exocytosis: new organelles for non-secretory purposes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:181-187.2005).
- Chintagari NR, Jin N, Wang P, Narasaraju TA, Chen J, Liu L (Effect of cholesterol depletion on exocytosis of alveolar type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34:677-687.2006).
- Choi KS, Ghuman J, Kassam G, Kang HM, Fitzpatrick SL, Waisman DM (Annexin II tetramer inhibits plasmin-dependent fibrinolysis. *Biochemistry* 37:648-655.1998).
- Chow A, Davis AJ, Gawler DJ (Identification of a novel protein complex containing annexin VI, Fyn, Pyk2, and the p120(GAP) C2 domain. *FEBS letters* 469:88-92.2000).
- Chung CY, Erickson HP (Cell surface annexin II is a high affinity receptor for the alternatively spliced segment of tenascin-C. *J Cell Biol* 126:539-548.1994).
- Chung CY, Murphy-Ullrich JE, Erickson HP (Mitogenesis, cell migration, and loss of focal adhesions induced by tenascin-C interacting with its cell surface receptor, annexin II. *Mol Biol Cell* 7:883-892.1996).
- Cookson EA, Conte IL, Dempster J, Hannah MJ, Carter T (Characterisation of Weibel-Palade body fusion by amperometry in endothelial cells reveals fusion pore dynamics and the effect of cholesterol on exocytosis. *J Cell Sci* 126:5490-5499.2013).
- Coupland RE (The natural history of the chromaffin cell--twenty-five years on the beginning. *Arch Histol Cytol* 52 Suppl:331-341.1989).
- Courel M, Rodemer C, Nguyen ST, Pance A, Jackson AP, O'Connor D T, Taupenot L (Secretory granule biogenesis in sympathoadrenal cells: identification of a granulogenic determinant in the secretory prohormone chromogranin A. *The Journal of biological chemistry* 281:38038-38051.2006).
- Creutz CE, Dowling LG, Sando JJ, Villar-Palasi C, Whipple JH, Zaks WJ (Characterization of the chromobindins. Soluble proteins that bind to the chromaffin granule membrane in the presence of Ca<sup>2+</sup>. *J Biol Chem* 258:14664-14674.1983).
- Crivellato E, Nico B, Ribatti D (The chromaffin vesicle: advances in understanding the composition of a versatile, multifunctional secretory organelle. *Anat Rec (Hoboken)* 291:1587-1602.2008).

## D

- Darchen F, Senyshyn J, Brondyk WH, Taatjes DJ, Holz RW, Henry JP, Denizot JP, Macara IG (The GTPase Rab3a is associated with large dense core vesicles in bovine chromaffin cells and rat PC12 cells. *J Cell Sci* 108 ( Pt 4):1639-1649.1995).
- Dassah M, Deora AB, He K, Hajjar KA (The endothelial cell annexin A2 system and vascular fibrinolysis. *Gen Physiol Biophys* 28 Spec No Focus:F20-28.2009).
- Davis TA, Loos B, Engelbrecht AM (AHNAK: the giant jack of all trades. *Cell Signal* 26:2683-2693.2014).
- de Graauw M, Cao L, Winkel L, van Miltenburg MH, le Devedec SE, Klop M, Yan K, Pont C, Rogkoti VM, Tijssma A, Chaudhuri A, Lalai R, Price L, Verbeek F, van de Water B (Annexin A2 depletion delays EGFR endocytic trafficking via cofilin activation and enhances EGFR signaling and metastasis formation. *Oncogene* 33:2610-2619.2014).

- De Seranno S, Benaud C, Assard N, Khediri S, Gerke V, Baudier J, Delphin C (Identification of an AHNAK binding motif specific for the Annexin2/S100A10 tetramer. *The Journal of biological chemistry* 281:35030-35038.2006).
- Delouche B, Pradel LA, Henry JP (Phosphorylation by protein kinase C of annexin 2 in chromaffin cells stimulated by nicotine. *J Neurochem* 68:1720-1727.1997).
- Deora AB, Kreitzer G, Jacovina AT, Hajjar KA (An annexin 2 phosphorylation switch mediates p11-dependent translocation of annexin 2 to the cell surface. *The Journal of biological chemistry* 279:43411-43418.2004).
- DePina AS, Langford GM (Vesicle transport: the role of actin filaments and myosin motors. *Microsc Res Tech* 47:93-106.1999).
- Derry MC, Sutherland MR, Restall CM, Waisman DM, Pryzdial EL (Annexin 2-mediated enhancement of cytomegalovirus infection opposes inhibition by annexin 1 or annexin 5. *J Gen Virol* 88:19-27.2007).
- Desnos C, Huet S, Darchen F ('Should I stay or should I go?': myosin V function in organelle trafficking. *Biol Cell* 99:411-423.2007a).
- Desnos C, Huet S, Fanget I, Chapuis C, Bottiger C, Racine V, Sibarita JB, Henry JP, Darchen F (Myosin va mediates docking of secretory granules at the plasma membrane. *J Neurosci* 27:10636-10645.2007b).
- Desnos C, Schonn JS, Huet S, Tran VS, El-Amraoui A, Raposo G, Fanget I, Chapuis C, Menasche G, de Saint Basile G, Petit C, Cribier S, Henry JP, Darchen F (Rab27A and its effector MyRIP link secretory granules to F-actin and control their motion towards release sites. *J Cell Biol* 163:559-570.2003).
- Dhanvantari S, Loh YP (Lipid raft association of carboxypeptidase E is necessary for its function as a regulated secretory pathway sorting receptor. *The Journal of biological chemistry* 275:29887-29893.2000).
- Di Paolo G, De Camilli P (Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443:651-657.2006).
- Diaz-Flores L, Gutierrez R, Varela H, Valladares F, Alvarez-Arguelles H, Borges R (Histogenesis and morphofunctional characteristics of chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)* 192:145-163.2008).
- Diaz O, Mebarek-Azzam S, Benzaria A, Dubois M, Lagarde M, Nemoz G, Prigent AF (Disruption of lipid rafts stimulates phospholipase d activity in human lymphocytes: implication in the regulation of immune function. *J Immunol* 175:8077-8086.2005).
- Diaz VM, Hurtado M, Thomson TM, Reventos J, Paciucci R (Specific interaction of tissue-type plasminogen activator (t-PA) with annexin II on the membrane of pancreatic cancer cells activates plasminogen and promotes invasion in vitro. *Gut* 53:993-1000.2004).
- Donato R (Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta* 1450:191-231.1999).
- Dong Z, Yao M, Zhang H, Wang L, Huang H, Yan M, Wu W, Yao D (Inhibition of Annexin A2 gene transcription is a promising molecular target for hepatoma cell proliferation and metastasis. *Oncol Lett* 7:28-34.2014).
- Dorean BW, Fulop TG, Smith CB (Myosin II activation and actin reorganization regulate the mode of quantal exocytosis in mouse adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* 28:4470-4478.2008).
- Drucker P, Pejic M, Galla HJ, Gerke V (Lipid segregation and membrane budding induced by the peripheral membrane binding protein annexin A2. *The Journal of biological chemistry* 288:24764-24776.2013).

- Drust DS, Creutz CE (Aggregation of chromaffin granules by calpactin at micromolar levels of calcium. *Nature* 331:88-91.1988).
- Dulubova I, Khvotchev M, Liu S, Huryeva I, Sudhof TC, Rizo J (Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:2697-2702.2007).
- Dulubova I, Sugita S, Hill S, Hosaka M, Fernandez I, Sudhof TC, Rizo J (A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *EMBO J* 18:4372-4382.1999).
- Dziduszko A, Ozbun MA (Annexin A2 and S100A10 regulate human papillomavirus type 16 entry and intracellular trafficking in human keratinocytes. *J Virol* 87:7502-7515.2013).

## E-F

- Eberhard DA, Karns LR, VandenBerg SR, Creutz CE (Control of the nuclear-cytoplasmic partitioning of annexin II by a nuclear export signal and by p11 binding. *J Cell Sci* 114:3155-3166.2001).
- Ebert AD, Laussmann M, Wegehingel S, Kaderali L, Erfle H, Reichert J, Lechner J, Beer HD, Pepperkok R, Nickel W (Tec-kinase-mediated phosphorylation of fibroblast growth factor 2 is essential for unconventional secretion. *Traffic* 11:813-826.2010).
- Elhamdani A, Azizi F, Artalejo CR (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* 26:3030-3036.2006).
- Elias S, Delestre C, Ory S, Marais S, Courel M, Vazquez-Martinez R, Bernard S, Coquet L, Malagon MM, Driouich A, Chan P, Gasman S, Anouar Y, Montero-Hadjadje M (Chromogranin A induces the biogenesis of granules with calcium- and actin-dependent dynamics and exocytosis in constitutively secreting cells. *Endocrinology* 153:4444-4456.2012).
- Erikson E, Erikson RL (Identification of a cellular protein substrate phosphorylated by the avian sarcoma virus-transforming gene product. *Cell* 21:829-836.1980).
- Erikson E, Tomasiewicz HG, Erikson RL (Biochemical characterization of a 34-kilodalton normal cellular substrate of pp60v-src and an associated 6-kilodalton protein. *Mol Cell Biol* 4:77-85.1984).
- Evans TC, Jr., Nelsestuen GL (Calcium and membrane-binding properties of monomeric and multimeric annexin II. *Biochemistry* 33:13231-13238.1994).
- Falsey RR, Marron MT, Gunaherath GM, Shirahatti N, Mahadevan D, Gunatilaka AA, Whitesell L (Actin microfilament aggregation induced by withaferin A is mediated by annexin II. *Nat Chem Biol* 2:33-38.2006).
- Fan X, Krahling S, Smith D, Williamson P, Schlegel RA (Macrophage surface expression of annexins I and II in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes. *Mol Biol Cell* 15:2863-2872.2004).
- Faure AV, Migne C, Devilliers G, Ayala-Sanmartin J (Annexin 2 "secretion" accompanying exocytosis of chromaffin cells: possible mechanisms of annexin release. *Exp Cell Res* 276:79-89.2002).
- Faure J, Lachenal G, Court M, Hirrlinger J, Chatellard-Causse C, Blot B, Grange J, Schoehn G, Goldberg Y, Boyer V, Kirchhoff F, Raposo G, Garin J, Sadoul R (Exosomes are released

- by cultured cortical neurones. *Molecular and cellular neurosciences* 31:642-648.2006).
- Felez J, Miles LA, Fabregas P, Jardi M, Plow EF, Lijnen RH (Characterization of cellular binding sites and interactive regions within reactants required for enhancement of plasminogen activation by tPA on the surface of leukocytic cells. *Thromb Haemost* 76:577-584.1996).
- Felmy F (Modulation of cargo release from dense core granules by size and actin network. *Traffic* 8:983-997.2007).
- Filipenko NR, Waisman DM (The C terminus of annexin II mediates binding to F-actin. *J Biol Chem* 276:5310-5315.2001).
- Flood EC, Hajjar KA (The annexin A2 system and vascular homeostasis. *Vascular pharmacology* 54:59-67.2011).
- Foulkes T, Nassar MA, Lane T, Matthews EA, Baker MD, Gerke V, Okuse K, Dickenson AH, Wood JN (Deletion of annexin 2 light chain p11 in nociceptors causes deficits in somatosensory coding and pain behavior. *J Neurosci* 26:10499-10507.2006).

## G

- Gabel M, Chasserot-Golaz S (Annexin A2, an essential partner of the exocytotic process in chromaffin cells. *J Neurochem* 137:890-896.2016).
- Gabel M, Delavoie F, Demais V, Royer C, Bailly Y, Vitale N, Bader MF, Chasserot-Golaz S (Annexin A2-dependent actin bundling promotes secretory granule docking to the plasma membrane and exocytosis. *J Cell Biol* 210:785-800.2015).
- Gasman S, Chasserot-Golaz S, Hubert P, Aunis D, Bader MF (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. *The Journal of biological chemistry* 273:16913-16920.1998).
- Gasman S, Chasserot-Golaz S, Malacombe M, Way M, Bader MF (Regulated exocytosis in neuroendocrine cells: a role for subplasmalemmal Cdc42/N-WASP-induced actin filaments. *Mol Biol Cell* 15:520-531.2004).
- Gauthier-Kemper A, Weissmann C, Golovyashkina N, Sebo-Lemke Z, Drewes G, Gerke V, Heinisch JJ, Brandt R (The frontotemporal dementia mutation R406W blocks tau's interaction with the membrane in an annexin A2-dependent manner. *J Cell Biol* 192:647-661.2011).
- Gerke V, Creutz CE, Moss SE (Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:449-461.2005).
- Gerke V, Moss SE (Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* 82:331-371.2002).
- Gerke V, Weber K (Identity of p36K phosphorylated upon Rous sarcoma virus transformation with a protein purified from brush borders; calcium-dependent binding to non-erythroid spectrin and F-actin. *EMBO J* 3:227-233.1984).
- Gerke V, Weber K (The regulatory chain in the p36-kd substrate complex of viral tyrosine-specific protein kinases is related in sequence to the S-100 protein of glial cells. *EMBO J* 4:2917-2920.1985).
- Gincel D, Regan MR, Jin L, Watkins AM, Bergles DE, Rothstein JD (Analysis of cerebellar Purkinje cells using EAAT4 glutamate transporter promoter reporter in mice

- generated via bacterial artificial chromosome-mediated transgenesis. *Exp Neurol* 203:205-212.2007).
- Giraudo CG, Eng WS, Melia TJ, Rothman JE (A clamping mechanism involved in SNARE-dependent exocytosis. *Science* 313:676-680.2006).
- Glenney JR, Jr. (Calpactins: calcium-regulated membrane-skeletal proteins. *Biochem Soc Trans* 15:798-800.1987).
- Glenney JR, Jr., Tack B, Powell MA (Calpactins: two distinct Ca<sup>++</sup>-regulated phospholipid- and actin-binding proteins isolated from lung and placenta. *J Cell Biol* 104:503-511.1987).
- Glenney JR, Jr., Tack BF (Amino-terminal sequence of p36 and associated p10: identification of the site of tyrosine phosphorylation and homology with S-100. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:7884-7888.1985).
- Goehring AS, Pedroja BS, Hinke SA, Langeberg LK, Scott JD (MyRIP anchors protein kinase A to the exocyst complex. *The Journal of biological chemistry* 282:33155-33167.2007).
- Gokhale NA, Abraham A, Digman MA, Gratton E, Cho W (Phosphoinositide specificity of and mechanism of lipid domain formation by annexin A2-p11 heterotetramer. *J Biol Chem* 280:42831-42840.2005).
- Gong LW, Di Paolo G, Diaz E, Cestra G, Diaz ME, Lindau M, De Camilli P, Toomre D (Phosphatidylinositol phosphate kinase type I gamma regulates dynamics of large dense-core vesicle fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:5204-5209.2005).
- Gonzalez-Jamett AM, Momboisse F, Guerra MJ, Ory S, Baez-Matus X, Barraza N, Calco V, Houy S, Couve E, Neely A, Martinez AD, Gasman S, Cardenas AM (Dynamin-2 regulates fusion pore expansion and quantal release through a mechanism that involves actin dynamics in neuroendocrine chromaffin cells. *PLoS One* 8:e70638.2013).
- Gonzalez-Reyes S, Garcia-Manso A, del Barrio G, Dalton KP, Gonzalez-Molleda L, Arrojo-Fernandez J, Nicieza I, Parra F (Role of annexin A2 in cellular entry of rabbit vesivirus. *J Gen Virol* 90:2724-2730.2009).
- Gould KL, Woodgett JR, Isacke CM, Hunter T (The protein-tyrosine kinase substrate p36 is also a substrate for protein kinase C in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol* 6:2738-2744.1986).
- Grant NJ, Hepp R, Krause W, Aunis D, Oehme P, Langley K (Differential expression of SNAP-25 isoforms and SNAP-23 in the adrenal gland. *J Neurochem* 72:363-372.1999).
- Grieve AG, Moss SE, Hayes MJ (Annexin A2 at the interface of actin and membrane dynamics: a focus on its roles in endocytosis and cell polarization. *Int J Cell Biol* 2012:852430.2012).
- Grindheim AK, Hollas H, Raddum AM, Saraste J, Vedeler A (Reactive oxygen species exert opposite effects on Tyr23 phosphorylation of the nuclear and cortical pools of annexin A2. *J Cell Sci* 129:314-328.2016).
- Guan JL (Cell biology. Integrins, rafts, Rac, and Rho. *Science* 303:773-774.2004).
- Gutierrez LM (New insights into the role of the cortical cytoskeleton in exocytosis from neuroendocrine cells. *Int Rev Cell Mol Biol* 295:109-137.2012).

## H

- Hajjar KA, Jacovina AT, Chacko J (An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *The Journal of biological chemistry* 269:21191-21197.1994).
- Hankins JL, Ward KE, Linton SS, Barth BM, Stahelin RV, Fox TE, Kester M (Ceramide 1-phosphate mediates endothelial cell invasion via the annexin a2-p11 heterotetrameric protein complex. *The Journal of biological chemistry* 288:19726-19738.2013).
- Hansen MD, Ehrlich JS, Nelson WJ (Molecular mechanism for orienting membrane and actin dynamics to nascent cell-cell contacts in epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 277:45371-45376.2002).
- Harata NC, Aravanis AM, Tsien RW (Kiss-and-run and full-collapse fusion as modes of exo-endocytosis in neurosecretion. *J Neurochem* 97:1546-1570.2006).
- Hartwig JH, Thelen M, Rosen A, Janmey PA, Nairn AC, Aderem A (MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* 356:618-622.1992).
- Hata Y, Slaughter CA, Sudhof TC (Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. *Nature* 366:347-351.1993).
- Hayes MJ, Rescher U, Gerke V, Moss SE (Annexin-actin interactions. *Traffic* 5:571-576.2004).
- Hayes MJ, Shao D, Bailly M, Moss SE (Regulation of actin dynamics by annexin 2. *Embo J* 25:1816-1826.2006).
- He KL, Sui G, Xiong H, Broekman MJ, Huang B, Marcus AJ, Hajjar KA (Feedback regulation of endothelial cell surface plasmin generation by PKC-dependent phosphorylation of annexin A2. *The Journal of biological chemistry* 286:15428-15439.2011).
- Head BP, Patel HH, Insel PA (Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. *Biochim Biophys Acta* 1838:532-545.2014).
- Heider MR, Munson M (Exorcising the exocyst complex. *Traffic* 13:898-907.2012).
- Hering H, Lin CC, Sheng M (Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J Neurosci* 23:3262-3271.2003).
- Hirata A, Hirata F (Lipocortin (Annexin) I heterotetramer binds to purine RNA and pyrimidine DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 265:200-204.1999).
- Hitchcock JK, Katz AA, Schafer G (Dynamic reciprocity: the role of annexin A2 in tissue integrity. *J Cell Commun Signal* 8:125-133.2014).
- Ho WT, Xie Z, Zhao ZJ, Exton JH (Tyrosine phosphorylation of phospholipase D1 by v-Src does not per se result in activation. *Cell Signal* 17:691-699.2005).
- Hohaus A, Person V, Behlke J, Schaper J, Morano I, Haase H (The carboxyl-terminal region of ahnak provides a link between cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels and the actin-based cytoskeleton. *FASEB J* 16:1205-1216.2002).
- Houy S, Croise P, Gubar O, Chasserot-Golaz S, Tryoen-Toth P, Bailly Y, Ory S, Bader MF, Gasman S (Exocytosis and endocytosis in neuroendocrine cells: inseparable membranes! *Front Endocrinol (Lausanne)* 4:135.2013).

- Houy S, Estay-Ahumada C, Croise P, Calco V, Haeberle AM, Bailly Y, Billuart P, Vitale N, Bader MF, Ory S, Gasman S (Oligophrenin-1 Connects Exocytotic Fusion to Compensatory Endocytosis in Neuroendocrine Cells. *J Neurosci* 35:11045-11055.2015).
- Huai J, Zhang Y, Liu QM, Ge HY, Arendt-Nielsen L, Jiang H, Yue SW (Interaction of transient receptor potential vanilloid 4 with annexin A2 and tubulin beta 5. *Neurosci Lett* 512:22-27.2012).
- Huang SH, Long M, Wu CH, Kwon-Chung KJ, Chang YC, Chi F, Lee S, Jong A (Invasion of *Cryptococcus neoformans* into human brain microvascular endothelial cells is mediated through the lipid rafts-endocytic pathway via the dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 3 (DYRK3). *The Journal of biological chemistry* 286:34761-34769.2011).
- Hubaishy I, Jones PG, Bjorge J, Bellagamba C, Fitzpatrick S, Fujita DJ, Waisman DM (Modulation of annexin II tetramer by tyrosine phosphorylation. *Biochemistry* 34:14527-14534.1995).
- Huet S, Fanget I, Jouannot O, Meireles P, Zeiske T, Larochette N, Darchen F, Desnos C (Myrip couples the capture of secretory granules by the actin-rich cell cortex and their attachment to the plasma membrane. *J Neurosci* 32:2564-2577.2012).
- Huh YH, Jeon SH, Yoo SH (Chromogranin B-induced secretory granule biogenesis: comparison with the similar role of chromogranin A. *The Journal of biological chemistry* 278:40581-40589.2003).
- Humeau Y, Vitale N, Chasserot-Golaz S, Dupont JL, Du G, Frohman MA, Bader MF, Poulain B (A role for phospholipase D1 in neurotransmitter release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:15300-15305.2001).
- Hyenne V, Apaydin A, Rodriguez D, Spiegelhalter C, Hoff-Yoessle S, Diem M, Tak S, Lefebvre O, Schwab Y, Goetz JG, Labouesse M (RAL-1 controls multivesicular body biogenesis and exosome secretion. *J Cell Biol* 211:27-37.2015).

## I-J

- Ikebuchi NW, Waisman DM (Calcium-dependent regulation of actin filament bundling by lipocortin-85. *J Biol Chem* 265:3392-3400.1990).
- Jackson MB, Chapman ER (Fusion pores and fusion machines in Ca<sup>2+</sup>-triggered exocytosis. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 35:135-160.2006).
- Jackson MB, Chapman ER (The fusion pores of Ca<sup>2+</sup> -triggered exocytosis. *Nat Struct Mol Biol* 15:684-689.2008).
- James DJ, Khodthong C, Kowalchuk JA, Martin TF (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates SNARE-dependent membrane fusion. *J Cell Biol* 182:355-366.2008).
- Jeng RL, Welch MD (Cytoskeleton: actin and endocytosis--no longer the weakest link. *Curr Biol* 11:R691-694.2001).
- Jin L, Millard AC, Wuskell JP, Dong X, Wu D, Clark HA, Loew LM (Characterization and application of a new optical probe for membrane lipid domains. *Biophys J* 90:2563-2575.2006).
- Jindal HK, Chaney WG, Anderson CW, Davis RG, Vishwanatha JK (The protein-tyrosine kinase substrate, calpactin I heavy chain (p36), is part of the primer recognition protein complex that interacts with DNA polymerase alpha. *J Biol Chem* 266:5169-5176.1991).

- Johannes L, Doussau F, Clabecq A, Henry JP, Darchen F, Poulain B (Evidence for a functional link between Rab3 and the SNARE complex. *J Cell Sci* 109 ( Pt 12):2875-2884.1996).
- Johnsson N, Nguyen Van P, Soling HD, Weber K (Functionally distinct serine phosphorylation sites of p36, the cellular substrate of retroviral protein kinase; differential inhibition of reassociation with p11. *EMBO J* 5:3455-3460.1986).
- Johnstone SA, Hubaishy I, Waisman DM (Phosphorylation of annexin II tetramer by protein kinase C inhibits aggregation of lipid vesicles by the protein. *J Biol Chem* 267:25976-25981.1992).
- Jones PG, Moore GJ, Waisman DM (A nonapeptide to the putative F-actin binding site of annexin-II tetramer inhibits its calcium-dependent activation of actin filament bundling. *J Biol Chem* 267:13993-13997.1992).
- Jost M, Gerke V (Mapping of a regulatory important site for protein kinase C phosphorylation in the N-terminal domain of annexin II. *Biochim Biophys Acta* 1313:283-289.1996).
- Jost M, Zeuschner D, Seemann J, Weber K, Gerke V (Identification and characterization of a novel type of annexin-membrane interaction: Ca<sup>2+</sup> is not required for the association of annexin II with early endosomes. *J Cell Sci* 110 ( Pt 2):221-228.1997).
- Jung Y, Wang J, Song J, Shiozawa Y, Havens A, Wang Z, Sun YX, Emerson SG, Krebsbach PH, Taichman RS (Annexin II expressed by osteoblasts and endothelial cells regulates stem cell adhesion, homing, and engraftment following transplantation. *Blood* 110:82-90.2007).

## K

- Kim J, Hajjar KA (Annexin II: a plasminogen-plasminogen activator co-receptor. *Front Biosci* 7:d341-348.2002).
- Kim T, Gondre-Lewis MC, Arnaoutova I, Loh YP (Dense-core secretory granule biogenesis. *Physiology (Bethesda)* 21:124-133.2006).
- Kim T, Tao-Cheng JH, Eiden LE, Loh YP (Chromogranin A, an "on/off" switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. *Cell* 106:499-509.2001).
- Kim Y, Han JM, Han BR, Lee KA, Kim JH, Lee BD, Jang IH, Suh PG, Ryu SH (Phospholipase D1 is phosphorylated and activated by protein kinase C in caveolin-enriched microdomains within the plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* 275:13621-13627.2000).
- Kirov A, Al-Hashimi H, Solomon P, Mazur C, Thorpe PE, Sims PJ, Tarantini F, Kumar TK, Prudovsky I (Phosphatidylserine externalization and membrane blebbing are involved in the nonclassical export of FGF1. *J Cell Biochem* 113:956-966.2012).
- Knecht V, Grubmuller H (Mechanical coupling via the membrane fusion SNARE protein syntaxin 1A: a molecular dynamics study. *Biophys J* 84:1527-1547.2003).
- Knop M, Aareskjold E, Bode G, Gerke V (Rab3D and annexin A2 play a role in regulated secretion of vWF, but not tPA, from endothelial cells. *Embo J* 23:2982-2992.2004).
- Koch M, Holt M (Coupling exo- and endocytosis: an essential role for PIP(2) at the synapse. *Biochim Biophys Acta* 1821:1114-1132.2012).
- Kooijman EE, Chupin V, Fuller NL, Kozlov MM, de Kruijff B, Burger KN, Rand PR (Spontaneous curvature of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Biochemistry* 44:2097-2102.2005).

## L

- Lachenal G, Pernet-Gallay K, Chivet M, Hemming FJ, Belly A, Bodon G, Blot B, Haase G, Goldberg Y, Sadoul R (Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Molecular and cellular neurosciences* 46:409-418.2011).
- Lambert O, Cavusoglu N, Gallay J, Vincent M, Rigaud JL, Henry JP, Ayala-Sanmartin J (Novel organization and properties of annexin 2-membrane complexes. *J Biol Chem* 279:10872-10882.2004).
- Landriscina M, Soldi R, Bagala C, Micucci I, Bellum S, Tarantini F, Prudovsky I, Maciag T (S100A13 participates in the release of fibroblast growth factor 1 in response to heat shock in vitro. *The Journal of biological chemistry* 276:22544-22552.2001).
- Lang T (SNARE proteins and 'membrane rafts'. *J Physiol* 585:693-698.2007).
- Lang T, Margittai M, Holzler H, Jahn R (SNAREs in native plasma membranes are active and readily form core complexes with endogenous and exogenous SNAREs. *J Cell Biol* 158:751-760.2002).
- Larina O, Bhat P, Pickett JA, Launikonis BS, Shah A, Kruger WA, Edwardson JM, Thorn P (Dynamic regulation of the large exocytotic fusion pore in pancreatic acinar cells. *Mol Biol Cell* 18:3502-3511.2007).
- Lauvrak SU, Hollas H, Doskeland AP, Aukrust I, Flatmark T, Vedeler A (Ubiquitinated annexin A2 is enriched in the cytoskeleton fraction. *FEBS Lett* 579:203-206.2005).
- LaVallee TM, Tarantini F, Gamble S, Mouta Carreira C, Jackson A, Maciag T (Synaptotagmin-1 is required for fibroblast growth factor-1 release. *The Journal of biological chemistry* 273:22217-22223.1998).
- Lee DB, Jamgotchian N, Allen SG, Kan FW, Hale IL (Annexin A2 Heterotetramer: Role in Tight Junction Assembly. *Am J Physiol Renal Physiol*.2004).
- Lewit-Bentley A, Rety S, Sopkova-de Oliveira Santos J, Gerke V (S100-annexin complexes: some insights from structural studies. *Cell Biol Int* 24:799-802.2000).
- Li F, Pincet F, Perez E, Eng WS, Melia TJ, Rothman JE, Taresté D (Energetics and dynamics of SNAREpin folding across lipid bilayers. *Nat Struct Mol Biol* 14:890-896.2007).
- Li Q, Ho CS, Marinescu V, Bhatti H, Bokoch GM, Ernst SA, Holz RW, Stuenkel EL (Facilitation of Ca(2+)-dependent exocytosis by Rac1-GTPase in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 550:431-445.2003).
- Liu Y, Myrvang HK, Dekker LV (Annexin A2 complexes with S100 proteins: structure, function and pharmacological manipulation. *Br J Pharmacol* 172:1664-1676.2015).
- Lizarbe MA, Barrasa JI, Olmo N, Gavilanes F, Turnay J (Annexin-phospholipid interactions. Functional implications. *Int J Mol Sci* 14:2652-2683.2013).

## M

- Ma C, Li W, Xu Y, Rizo J (Munc13 mediates the transition from the closed syntaxin-Munc18 complex to the SNARE complex. *Nat Struct Mol Biol* 18:542-549.2011).
- MacLeod TJ, Kwon M, Filipenko NR, Waisman DM (Phospholipid-associated annexin A2-S100A10 heterotetramer and its subunits: characterization of the interaction with

- tissue plasminogen activator, plasminogen, and plasmin. *The Journal of biological chemistry* 278:25577-25584.2003).
- Madureira PA, Surette AP, Phipps KD, Taboski MA, Miller VA, Waisman DM (The role of the annexin A2 heterotetramer in vascular fibrinolysis. *Blood* 118:4789-4797.2011).
- Mahata SK, Mahata M, Livsey Taylor CV, Taupenot L, Parmer RJ, O'Connor DT (The novel catecholamine release-inhibitory peptide catestatin (chromogranin A344-364). Properties and function. *Adv Exp Med Biol* 482:263-277.2000).
- Mai J, Finley RL, Jr., Waisman DM, Sloane BF (Human procathepsin B interacts with the annexin II tetramer on the surface of tumor cells. *The Journal of biological chemistry* 275:12806-12812.2000a).
- Mai J, Waisman DM, Sloane BF (Cell surface complex of cathepsin B/annexin II tetramer in malignant progression. *Biochim Biophys Acta* 1477:215-230.2000b).
- Malacombe M, Bader MF, Gasman S (Exocytosis in neuroendocrine cells: new tasks for actin. *Biochim Biophys Acta* 1763:1175-1183.2006).
- Malhotra R, Ward M, Bright H, Priest R, Foster MR, Hurle M, Blair E, Bird M (Isolation and characterisation of potential respiratory syncytial virus receptor(s) on epithelial cells. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 5:123-133.2003).
- Marqueze B, Berton F, Seagar M (Synaptotagmins in membrane traffic: which vesicles do the tagmins tag? *Biochimie* 82:409-420.2000).
- Martin-Belmonte F, Gassama A, Datta A, Yu W, Rescher U, Gerke V, Mostov K (PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42. *Cell* 128:383-397.2007).
- Martin TF (Role of PI(4,5)P(2) in vesicle exocytosis and membrane fusion. *Subcell Biochem* 59:111-130.2012).
- Martin TF (PI(4,5)P(2)-binding effector proteins for vesicle exocytosis. *Biochim Biophys Acta* 1851:785-793.2015).
- Matsuda D, Nakayama Y, Horimoto S, Kuga T, Ikeda K, Kasahara K, Yamaguchi N (Involvement of Golgi-associated Lyn tyrosine kinase in the translocation of annexin II to the endoplasmic reticulum under oxidative stress. *Exp Cell Res* 312:1205-1217.2006).
- Mayran N, Parton RG, Gruenberg J (Annexin II regulates multivesicular endosome biogenesis in the degradation pathway of animal cells. *Embo J* 22:3242-3253.2003).
- McCready J, Sims JD, Chan D, Jay DG (Secretion of extracellular hsp90alpha via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. *BMC Cancer* 10:294.2010).
- Menke M, Gerke V, Steinem C (Phosphatidylserine membrane domain clustering induced by annexin A2/S100A10 heterotetramer. *Biochemistry* 44:15296-15303.2005).
- Menke M, Ross M, Gerke V, Steinem C (The molecular arrangement of membrane-bound annexin A2-S100A10 tetramer as revealed by scanning force microscopy. *Chembiochem* 5:1003-1006.2004).
- Merrifield CJ, Rescher U, Almers W, Proust J, Gerke V, Sechi AS, Moss SE (Annexin 2 has an essential role in actin-based macropinocytic rocketing. *Curr Biol* 11:1136-1141.2001).
- Miklavc P, Ehinger K, Sultan A, Felder T, Paul P, Gottschalk KE, Frick M (Actin depolymerisation and crosslinking join forces with myosin II to contract actin coats on fused secretory vesicles. *J Cell Sci* 128:1193-1203.2015).
- Monastyrskaya K, Tschumi F, Babiychuk EB, Stroka D, Draeger A (Annexins sense changes in intracellular pH during hypoxia. *Biochem J* 409:65-75.2008).

- Monck JR, Oberhauser AF, Alvarez de Toledo G, Fernandez JM (Is swelling of the secretory granule matrix the force that dilates the exocytotic fusion pore? *Biophys J* 59:39-47.1991).
- Montero-Hadjadje M, Elias S, Chevalier L, Benard M, Tanguy Y, Turquier V, Galas L, Yon L, Malagon MM, Driouch A, Gasman S, Anouar Y (Chromogranin A promotes peptide hormone sorting to mobile granules in constitutively and regulated secreting cells: role of conserved N- and C-terminal peptides. *The Journal of biological chemistry* 284:12420-12431.2009).
- Morales M, Colicos MA, Goda Y (Actin-dependent regulation of neurotransmitter release at central synapses. *Neuron* 27:539-550.2000).
- Morel E, Gruenberg J (Annexin A2 binding to endosomes and functions in endosomal transport are regulated by tyrosine 23 phosphorylation. *J Biol Chem* 284:1604-1611.2009).
- Morel E, Parton RG, Gruenberg J (Annexin A2-dependent polymerization of actin mediates endosome biogenesis. *Dev Cell* 16:445-457.2009).
- Mosharov EV, Sulzer D (Analysis of exocytotic events recorded by amperometry. *Nature methods* 2:651-658.2005).
- Moss SE (How actin gets the PIP. *Sci Signal* 5:pe7.2012).
- Moss SE, Morgan RO (The annexins. *Genome Biol* 5:219.2004).
- Mravec B (A new focus on interoceptive properties of adrenal medulla. *Auton Neurosci* 120:10-17.2005).
- Muesch A, Hartmann E, Rohde K, Rubartelli A, Sitia R, Rapoport TA (A novel pathway for secretory proteins? *Trends in biochemical sciences* 15:86-88.1990).
- Myrvang HK, Guo X, Li C, Dekker LV (Protein interactions between surface annexin A2 and S100A10 mediate adhesion of breast cancer cells to microvascular endothelial cells. *FEBS Lett* 587:3210-3215.2013).

## N-O

- Nakata T, Sobue K, Hirokawa N (Conformational change and localization of calpactin I complex involved in exocytosis as revealed by quick-freeze, deep-etch electron microscopy and immunocytochemistry. *J Cell Biol* 110:13-25.1990).
- Nazmi AR, Ozorowski G, Pejic M, Whitelegge JP, Gerke V, Luecke H (N-terminal acetylation of annexin A2 is required for S100A10 binding. *Biol Chem* 393:1141-1150.2012).
- Neco P, Gil A, Del Mar Frances M, Viniestra S, Gutierrez LM (The role of myosin in vesicle transport during bovine chromaffin cell secretion. *Biochem J* 368:405-413.2002).
- Neco P, Giner D, del Mar Frances M, Viniestra S, Gutierrez LM (Differential participation of actin- and tubulin-based vesicle transport systems during secretion in bovine chromaffin cells. *Eur J Neurosci* 18:733-742.2003).
- Neco P, Giner D, Viniestra S, Borges R, Villarreal A, Gutierrez LM (New roles of myosin II during vesicle transport and fusion in chromaffin cells. *The Journal of biological chemistry* 279:27450-27457.2004).
- Nickel W, Seedorf M (Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24:287-308.2008).
- Nightingale TD, Cutler DF, Cramer LP (Actin coats and rings promote regulated exocytosis. *Trends Cell Biol* 22:329-337.2012).

- Ning L, Wang C, Ding X, Zhang Y, Wang X, Yue S (Functional interaction of TRPV4 channel protein with annexin A2 in DRG. *Neurological research* 34:685-693.2012).
- O'Connell PA, Waisman DM (Regulation of plasmin generation by the annexin A2 heterotetramer: a shift in perspective. *Future oncology* 8:763-765.2012).
- Okuse K, Malik-Hall M, Baker MD, Poon WY, Kong H, Chao MV, Wood JN (Annexin II light chain regulates sensory neuron-specific sodium channel expression. *Nature* 417:653-656.2002).
- Oliferenko S, Paiha K, Harder T, Gerke V, Schwarzler C, Schwarz H, Beug H, Gunthert U, Huber LA (Analysis of CD44-containing lipid rafts: Recruitment of annexin II and stabilization by the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 146:843-854.1999).
- Olivares MJ, Gonzalez-Jamett AM, Guerra MJ, Baez-Matus X, Haro-Acuna V, Martinez-Quiles N, Cardenas AM (Src kinases regulate de novo actin polymerization during exocytosis in neuroendocrine chromaffin cells. *PLoS One* 9:e99001.2014).
- Ory S, Ceridono M, Momboisse F, Houy S, Chasserot-Golaz S, Heintz D, Calco V, Haeberle AM, Espinoza FA, Sims PJ, Bailly Y, Bader MF, Gasman S (Phospholipid Scramblase-1-Induced Lipid Reorganization Regulates Compensatory Endocytosis in Neuroendocrine Cells. *J Neurosci* 33:3545-3556.2013).

## P

- Parmer RJ, Mahata M, Gong Y, Mahata SK, Jiang Q, O'Connor DT, Xi XP, Miles LA (Processing of chromogranin A by plasmin provides a novel mechanism for regulating catecholamine secretion. *J Clin Invest* 106:907-915.2000).
- Parsons SJ, Creutz CE (p60c-src activity detected in the chromaffin granule membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 134:736-742.1986).
- Pediconi MF, Gallegos CE, De Los Santos EB, Barrantes FJ (Metabolic cholesterol depletion hinders cell-surface trafficking of the nicotinic acetylcholine receptor. *Neuroscience* 128:239-249.2004).
- Peres C, Yart A, Perret B, Salles JP, Raynal P (Modulation of phosphoinositide 3-kinase activation by cholesterol level suggests a novel positive role for lipid rafts in lysophosphatidic acid signalling. *FEBS letters* 534:164-168.2003).
- Perretti M, Gavins FN (Annexin 1: an endogenous anti-inflammatory protein. *News Physiol Sci* 18:60-64.2003).
- Perrin D, Aunis D (Reorganization of alpha-fodrin induced by stimulation in secretory cells. *Nature* 315:589-592.1985).
- Pike LJ (Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res* 44:655-667.2003).
- Pike LJ (Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res* 47:1597-1598.2006).
- Plattner R, Kadlec L, DeMali KA, Kazlauskas A, Pendergast AM (c-Abl is activated by growth factors and Src family kinases and has a role in the cellular response to PDGF. *Genes Dev* 13:2400-2411.1999).
- Poea-Guyon S, Ammar MR, Erard M, Amar M, Moreau AW, Fossier P, Gleize V, Vitale N, Morel N (The V-ATPase membrane domain is a sensor of granular pH that controls the exocytotic machinery. *J Cell Biol* 203:283-298.2013).
- Powell MA, Glenney JR (Regulation of calpactin I phospholipid binding by calpactin I light-chain binding and phosphorylation by p60v-src. *Biochem J* 247:321-328.1987).

- Prior IA, Muncke C, Parton RG, Hancock JF (Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J Cell Biol* 160:165-170.2003).
- Prudovsky I, Bagala C, Tarantini F, Mandinova A, Soldi R, Bellum S, Maciag T (The intracellular translocation of the components of the fibroblast growth factor 1 release complex precedes their assembly prior to export. *J Cell Biol* 158:201-208.2002).
- Prudovsky I, Tarantini F, Landriscina M, Neivandt D, Soldi R, Kirov A, Small D, Kathir KM, Rajalingam D, Kumar TK (Secretion without Golgi. *J Cell Biochem* 103:1327-1343.2008).

## R

- Rabouille C, Malhotra V, Nickel W (Diversity in unconventional protein secretion. *J Cell Sci* 125:5251-5255.2012).
- Rai T, Mosoian A, Resh MD (Annexin 2 is not required for human immunodeficiency virus type 1 particle production but plays a cell type-dependent role in regulating infectivity. *J Virol* 84:9783-9792.2010).
- Rand JH (Antiphospholipid antibody-mediated disruption of the annexin-V antithrombotic shield: a thrombogenic mechanism for the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun* 15:107-111.2000).
- Raynal P, Pollard HB (Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1197:63-93.1994).
- Raynor CM, Wright JF, Waisman DM, Pryzdial EL (Annexin II enhances cytomegalovirus binding and fusion to phospholipid membranes. *Biochemistry* 38:5089-5095.1999).
- Regnouf F, Sagot I, Delouche B, Devilliers G, Cartaud J, Henry JP, Pradel LA ("In vitro" phosphorylation of annexin 2 heterotetramer by protein kinase C. Comparative properties of the unphosphorylated and phosphorylated annexin 2 on the aggregation and fusion of chromaffin granule membranes. *J Biol Chem* 270:27143-27150.1995).
- Rescher U, Ludwig C, Konietzko V, Kharitonov A, Gerke V (Tyrosine phosphorylation of annexin A2 regulates Rho-mediated actin rearrangement and cell adhesion. *J Cell Sci* 121:2177-2185.2008).
- Rescher U, Ruhe D, Ludwig C, Zobiack N, Gerke V (Annexin 2 is a phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate binding protein recruited to actin assembly sites at cellular membranes. *J Cell Sci* 117:3473-3480.2004).
- Rescher U, Zobiack N, Gerke V (Intact Ca(2+)-binding sites are required for targeting of annexin 1 to endosomal membranes in living HeLa cells. *J Cell Sci* 113 ( Pt 22):3931-3938.2000).
- Rety S, Sopkova J, Renouard M, Osterloh D, Gerke V, Tabaries S, Russo-Marie F, Lewit-Bentley A (The crystal structure of a complex of p11 with the annexin II N-terminal peptide. *Nat Struct Biol* 6:89-95.1999).
- Riedl J, Crevenna AH, Kessenbrock K, Yu JH, Neukirchen D, Bista M, Bradke F, Jenne D, Holak TA, Werb Z, Sixt M, Wedlich-Soldner R (Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nature methods* 5:605-607.2008).
- Rizo J, Rosenmund C (Synaptic vesicle fusion. *Nat Struct Mol Biol* 15:665-674.2008).

- Rizo J, Sudhof TC (The membrane fusion enigma: SNAREs, Sec1/Munc18 proteins, and their accomplices--guilty as charged? *Annu Rev Cell Dev Biol* 28:279-308.2012).
- Rodriguez Del Castillo A, Lemaire S, Tchakarov L, Jeyapragasan M, Doucet JP, Vitale ML, Trifaro JM (Chromaffin cell scinderin, a novel calcium-dependent actin filament-severing protein. *EMBO J* 9:43-52.1990).
- Rose SD, Lejen T, Casaletti L, Larson RE, Pene TD, Trifaro JM (Myosins II and V in chromaffin cells: myosin V is a chromaffin vesicle molecular motor involved in secretion. *J Neurochem* 85:287-298.2003).
- Ross M, Gerke V, Steinem C (Membrane composition affects the reversibility of annexin A2t binding to solid supported membranes: a QCM study. *Biochemistry* 42:3131-3141.2003).
- Rudolf R, Kogel T, Kuznetsov SA, Salm T, Schlicker O, Hellwig A, Hammer JA, 3rd, Gerdes HH (Myosin Va facilitates the distribution of secretory granules in the F-actin rich cortex of PC12 cells. *J Cell Sci* 116:1339-1348.2003).
- Rudolf R, Salm T, Rustom A, Gerdes HH (Dynamics of immature secretory granules: role of cytoskeletal elements during transport, cortical restriction, and F-actin-dependent tethering. *Mol Biol Cell* 12:1353-1365.2001).
- Rukmini R, Rawat SS, Biswas SC, Chattopadhyay A (Cholesterol organization in membranes at low concentrations: effects of curvature stress and membrane thickness. *Biophys J* 81:2122-2134.2001).
- Rushworth JV, Hooper NM (Lipid Rafts: Linking Alzheimer's Amyloid-beta Production, Aggregation, and Toxicity at Neuronal Membranes. *International journal of Alzheimer's disease* 2011:603052.2010).
- Rust MB, Maritzen T (Relevance of presynaptic actin dynamics for synapse function and mouse behavior. *Exp Cell Res* 335:165-171.2015).

## S

- Sagot I, Regnouf F, Henry JP, Pradel LA (Translocation of cytosolic annexin 2 to a Triton-insoluble membrane subdomain upon nicotine stimulation of chromaffin cultured cells. *FEBS letters* 410:229-234.1997).
- Salaun C, Gould GW, Chamberlain LH (Lipid raft association of SNARE proteins regulates exocytosis in PC12 cells. *The Journal of biological chemistry* 280:19449-19453.2005).
- Salaun C, James DJ, Chamberlain LH (Lipid rafts and the regulation of exocytosis. *Traffic* 5:255-264.2004).
- Santell L, Marotti KR, Levin EG (Targeting of tissue plasminogen activator into the regulated secretory pathway of neuroendocrine cells. *Brain Res* 816:258-265.1999).
- Sarafian T, Pradel LA, Henry JP, Aunis D, Bader MF (The participation of annexin II (calpactin I) in calcium-evoked exocytosis requires protein kinase C. *J Cell Biol* 114:1135-1147.1991).
- Sassa T, Harada S, Ogawa H, Rand JB, Maruyama IN, Hosono R (Regulation of the UNC-18-Caenorhabditis elegans syntaxin complex by UNC-13. *J Neurosci* 19:4772-4777.1999).
- Schengrund CL (Lipid rafts: keys to neurodegeneration. *Brain Res Bull* 82:7-17.2010).
- Schuck S, Simons K (Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. *J Cell Sci* 117:5955-5964.2004).

- Semov A, Moreno MJ, Onichtchenko A, Abulrob A, Ball M, Ekiel I, Pietrzynski G, Stanimirovic D, Alakhov V (Metastasis-associated protein S100A4 induces angiogenesis through interaction with Annexin II and accelerated plasmin formation. *The Journal of biological chemistry* 280:20833-20841.2005).
- Sharma MR, Koltowski L, Ownbey RT, Tuszyński GP, Sharma MC (Angiogenesis-associated protein annexin II in breast cancer: selective expression in invasive breast cancer and contribution to tumor invasion and progression. *Experimental and molecular pathology* 81:146-156.2006).
- Siddhanta A, Backer JM, Shields D (Inhibition of phosphatidic acid synthesis alters the structure of the Golgi apparatus and inhibits secretion in endocrine cells. *The Journal of biological chemistry* 275:12023-12031.2000).
- Siever DA, Erickson HP (Extracellular annexin II. *Int J Biochem Cell Biol* 29:1219-1223.1997).
- Simons K, Ikonen E (Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572.1997).
- Simons K, Toomre D (Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:31-39.2000).
- Simons K, Vaz WL (Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 33:269-295.2004).
- Sjogren B, Hamblin MW, Svenningsson P (Cholesterol depletion reduces serotonin binding and signaling via human 5-HT<sub>7</sub>(a) receptors. *Eur J Pharmacol* 552:1-10.2006).
- Sjogren B, Svenningsson P (Depletion of the lipid raft constituents, sphingomyelin and ganglioside, decreases serotonin binding at human 5-HT<sub>7</sub>(a) receptors in HeLa cells. *Acta Physiol (Oxf)* 190:47-53.2007).
- Soldi R, Mandinova A, Venkataraman K, Hla T, Vadas M, Pitson S, Duarte M, Graziani I, Kolev V, Kacer D, Kirov A, Maciag T, Prudovsky I (Sphingosine kinase 1 is a critical component of the copper-dependent FGF1 export pathway. *Exp Cell Res* 313:3308-3318.2007).
- Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE (SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362:318-324.1993).
- Somarajan SR, Al-Asadi F, Ramasamy K, Pandrangi L, Baseman JB, Kannan TR (Annexin A2 mediates *Mycoplasma pneumoniae* community-acquired respiratory distress syndrome toxin binding to eukaryotic cells. *MBio* 5.2014).
- Sopkova-de Oliveira Santos J, Oling FK, Rety S, Brisson A, Smith JC, Lewit-Bentley A (S100 protein-annexin interactions: a model of the (Anx2-p11)<sub>2</sub> heterotetramer complex. *Biochim Biophys Acta* 1498:181-191.2000).
- Spijkers-Hagelstein JA, Mimoso Pinhancos S, Schneider P, Pieters R, Stam RW (Src kinase-induced phosphorylation of annexin A2 mediates glucocorticoid resistance in MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 27:1063-1071.2013).
- Steringer JP, Bleicken S, Andreas H, Zacherl S, Laussmann M, Temmerman K, Contreras FX, Bharat TA, Lechner J, Muller HM, Briggs JA, Garcia-Saez AJ, Nickel W (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>)-dependent oligomerization of fibroblast growth factor 2 (FGF2) triggers the formation of a lipidic membrane pore implicated in unconventional secretion. *The Journal of biological chemistry* 287:27659-27669.2012).
- Stojilkovic SS (Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytosis and SNARE function. *Trends Endocrinol Metab* 16:81-83.2005).
- Sugita S (Mechanisms of exocytosis. *Acta Physiol (Oxf)* 192:185-193.2008).

- Sullivan DM, Wehr NB, Fergusson MM, Levine RL, Finkel T (Identification of oxidant-sensitive proteins: TNF-alpha induces protein glutathiolation. *Biochemistry* 39:11121-11128.2000).
- Sun J, Zhao J, Schwartz MA, Wang JY, Wiedmer T, Sims PJ (c-Abl tyrosine kinase binds and phosphorylates phospholipid scramblase 1. *The Journal of biological chemistry* 276:28984-28990.2001).
- Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT (Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395:347-353.1998).

## T

- Taberner FJ, Fernandez-Ballester G, Fernandez-Carvajal A, Ferrer-Montiel A (TRP channels interaction with lipids and its implications in disease. *Biochim Biophys Acta* 1848:1818-1827.2015).
- Tagaya M, Genma T, Yamamoto A, Kozaki S, Mizushima S (SNAP-25 is present on chromaffin granules and acts as a SNAP receptor. *FEBS letters* 394:83-86.1996).
- Tagaya M, Toyonaga S, Takahashi M, Yamamoto A, Fujiwara T, Akagawa K, Moriyama Y, Mizushima S (Syntaxin 1 (HPC-1) is associated with chromaffin granules. *The Journal of biological chemistry* 270:15930-15933.1995).
- Tanguy E, Carmon O, Wang Q, Jeandel L, Chasserot-Golaz S, Montero-Hadjadje M, Vitale N (Lipids implicated in the journey of a secretory granule: from biogenesis to fusion. *J Neurochem* 137:904-912.2016).
- Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT (The chromogranin-secretogranin family. *N Engl J Med* 348:1134-1149.2003).
- Temmerman K, Ebert AD, Muller HM, Sinning I, Tews I, Nickel W (A direct role for phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in unconventional secretion of fibroblast growth factor 2. *Traffic* 9:1204-1217.2008).
- Thiel C, Osborn M, Gerke V (The tight association of the tyrosine kinase substrate annexin II with the submembranous cytoskeleton depends on intact p11- and Ca(2+)-binding sites. *J Cell Sci* 103 ( Pt 3):733-742.1992).
- Tomas A, Moss SE (Calcium- and cell cycle-dependent association of annexin 11 with the nuclear envelope. *The Journal of biological chemistry* 278:20210-20216.2003).
- Tomatis VM, Papadopulos A, Malintan NT, Martin S, Wallis T, Gormal RS, Kendrick-Jones J, Buss F, Meunier FA (Myosin VI small insert isoform maintains exocytosis by tethering secretory granules to the cortical actin. *J Cell Biol* 200:301-320.2013).
- Toonen RF, de Vries KJ, Zalm R, Sudhof TC, Verhage M (Munc18-1 stabilizes syntaxin 1, but is not essential for syntaxin 1 targeting and SNARE complex formation. *J Neurochem* 93:1393-1400.2005).
- Toonen RF, Kochubey O, de Wit H, Gulyas-Kovacs A, Konijnenburg B, Sorensen JB, Klingauf J, Verhage M (Dissecting docking and tethering of secretory vesicles at the target membrane. *EMBO J* 25:3725-3737.2006a).
- Toonen RF, Wierda K, Sons MS, de Wit H, Cornelisse LN, Brussaard A, Plomp JJ, Verhage M (Munc18-1 expression levels control synapse recovery by regulating readily releasable pool size. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:18332-18337.2006b).

- Tooze SA, Flatmark T, Tooze J, Huttner WB (Characterization of the immature secretory granule, an intermediate in granule biogenesis. *J Cell Biol* 115:1491-1503.1991).
- Torres E, Rosen MK (Protein-tyrosine kinase and GTPase signals cooperate to phosphorylate and activate Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)/neuronal WASP. *The Journal of biological chemistry* 281:3513-3520.2006).
- Trifaro JM (Molecular biology of the chromaffin cell. *Ann N Y Acad Sci* 971:11-18.2002).
- Trifaro JM, Gasman S, Gutierrez LM (Cytoskeletal control of vesicle transport and exocytosis in chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)* 192:165-172.2008).
- Trifaro JM, Rose SD, Marcu MG (Scinderin, a Ca<sup>2+</sup>-dependent actin filament severing protein that controls cortical actin network dynamics during secretion. *Neurochem Res* 25:133-144.2000).
- Tsirka SE (Tissue plasminogen activator as a modulator of neuronal survival and function. *Biochem Soc Trans* 30:222-225.2002).
- Tzima E, Trotter PJ, Orchard MA, Walker JH (Annexin V binds to the actin-based cytoskeleton at the plasma membrane of activated platelets. *Exp Cell Res* 251:185-193.1999).

## U-V

- Umbrecht-Jenck E, Demais V, Calco V, Bailly Y, Bader MF, Chasserot-Golaz S (S100A10-mediated translocation of annexin-A2 to SNARE proteins in adrenergic chromaffin cells undergoing exocytosis. *Traffic* 11:958-971.2010).
- Urbe S, Dittie AS, Tooze SA (pH-dependent processing of secretogranin II by the endopeptidase PC2 in isolated immature secretory granules. *Biochem J* 321 ( Pt 1):65-74.1997).
- Valapala M, Maji S, Borejdo J, Vishwanatha JK (Cell surface translocation of annexin A2 facilitates glutamate-induced extracellular proteolysis. *The Journal of biological chemistry* 289:15915-15926.2014).
- Valapala M, Vishwanatha JK (Lipid raft endocytosis and exosomal transport facilitate extracellular trafficking of annexin A2. *The Journal of biological chemistry* 286:30911-30925.2011).
- Van Etten RA, Jackson PK, Baltimore D, Sanders MC, Matsudaira PT, Janmey PA (The COOH terminus of the c-Abl tyrosine kinase contains distinct F- and G-actin binding domains with bundling activity. *J Cell Biol* 124:325-340.1994).
- van Hoek ML, Allen CS, Parsons SJ (Phosphotyrosine phosphatase activity associated with c-Src in large multimeric complexes isolated from adrenal medullary chromaffin cells. *Biochem J* 326 ( Pt 1):271-277.1997).
- van Meer G, Sprong H (Membrane lipids and vesicular traffic. *Curr Opin Cell Biol* 16:373-378.2004).
- Veri MC, DeBell KE, Seminario MC, DiBaldassarre A, Reischl I, Rawat R, Graham L, Noviello C, Rellahan BL, Miscia S, Wange RL, Bonvini E (Membrane raft-dependent regulation of phospholipase C $\gamma$ -1 activation in T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 21:6939-6950.2001).
- Vishwanatha JK, Jindal HK, Davis RG (The role of primer recognition proteins in DNA replication: association with nuclear matrix in HeLa cells. *J Cell Sci* 101 ( Pt 1):25-34.1992).

- Vitale ML, Rodriguez Del Castillo A, Tchakarov L, Trifaro JM (Cortical filamentous actin disassembly and scinderin redistribution during chromaffin cell stimulation precede exocytosis, a phenomenon not exhibited by gelsolin. *J Cell Biol* 113:1057-1067.1991).
- Vitale ML, Seward EP, Trifaro JM (Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis. *Neuron* 14:353-363.1995).
- Vitale N, Caumont AS, Chasserot-Golaz S, Du G, Wu S, Sciorra VA, Morris AJ, Frohman MA, Bader MF (Phospholipase D1: a key factor for the exocytotic machinery in neuroendocrine cells. *EMBO J* 20:2424-2434.2001).
- Voets T, Toonen RF, Brian EC, de Wit H, Moser T, Rettig J, Sudhof TC, Neher E, Verhage M (Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking. *Neuron* 31:581-591.2001).
- Vorwerk CK, Gorla MS, Dreyer EB (An experimental basis for implicating excitotoxicity in glaucomatous optic neuropathy. *Survey of ophthalmology* 43 Suppl 1:S142-150.1999).

## W

- Waisman DM (Annexin II tetramer: structure and function. *Mol Cell Biochem* 149-150:301-322.1995).
- Wang CY, Lin CF (Annexin A2: its molecular regulation and cellular expression in cancer development. *Disease markers* 2014:308976.2014).
- Wang X, Yan R, Song J (DephosSite: a machine learning approach for discovering phosphatase-specific dephosphorylation sites. *Sci Rep* 6:23510.2016).
- Wang Y, Okamoto M, Schmitz F, Hofmann K, Sudhof TC (Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature* 388:593-598.1997).
- Weerth SH, Holtzclaw LA, Russell JT (Signaling proteins in raft-like microdomains are essential for Ca<sup>2+</sup> wave propagation in glial cells. *Cell Calcium* 41:155-167.2007).
- Weiss AN, Anantharam A, Bittner MA, Axelrod D, Holz RW (Luminal Protein within Secretory Granules Affects Fusion Pore Expansion. *Biophys J* 107:26-33.2014a).
- Weiss AN, Bittner MA, Holz RW, Axelrod D (Protein mobility within secretory granules. *Biophys J* 107:16-25.2014b).
- Wilson BS, Steinberg SL, Liederman K, Pfeiffer JR, Surviladze Z, Zhang J, Samelson LE, Yang LH, Kotula PG, Oliver JM (Markers for detergent-resistant lipid rafts occupy distinct and dynamic domains in native membranes. *Mol Biol Cell* 15:2580-2592.2004).
- Winkler H (Membrane composition of adrenergic large and small dense cored vesicles and of synaptic vesicles: consequences for their biogenesis. *Neurochem Res* 22:921-932.1997).
- Wirl G, Schwartz-Albiez R (Collagen-binding proteins of mammary epithelial cells are related to Ca<sup>2+</sup>(+)- and phospholipid-binding annexins. *J Cell Physiol* 144:511-522.1990).
- Woodham AW, Taylor JR, Jimenez AI, Skeate JG, Schmidt T, Brand HE, Da Silva DM, Kast WM (Small molecule inhibitors of the annexin A2 heterotetramer prevent human papillomavirus type 16 infection. *J Antimicrob Chemother* 70:1686-1690.2015).
- Wu BJ, Else PL, Storlien LH, Hulbert AJ (Molecular activity of Na(+)/K(+)-ATPase from different sources is related to the packing of membrane lipids. *J Exp Biol* 204:4271-4280.2001).

## X-Y-Z

- Xu XH, Pan W, Kang LH, Feng H, Song YQ (Association of annexin A2 with cancer development (Review). *Oncol Rep* 33:2121-2128.2015).
- Yang SL, Chou YT, Wu CN, Ho MS (Annexin II binds to capsid protein VP1 of enterovirus 71 and enhances viral infectivity. *J Virol* 85:11809-11820.2011).
- Yano A, Chen SP, Kita K, Jiang X, Ren Q, Sato T, Suzuki N (The involvement of annexin II in resistance to UVB-induced cell death and in the increased nucleotide excision repair capacity of UV-damaged DNA in human cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 77:307-311.2013).
- Yoo JC, Hayman MJ (Annexin II binds to SHP2 and this interaction is regulated by HSP70 levels. *Biochem Biophys Res Commun* 356:906-911.2007).
- Zeuschner D, Stoorvogel W, Gerke V (Association of annexin 2 with recycling endosomes requires either calcium- or cholesterol-stabilized membrane domains. *Eur J Cell Biol* 80:499-507.2001).
- Zhan Y, Counelis GJ, O'Rourke DM (The protein tyrosine phosphatase SHP-2 is required for EGFRvIII oncogenic transformation in human glioblastoma cells. *Exp Cell Res* 315:2343-2357.2009).
- Zhang M, Schekman R (Cell biology. Unconventional secretion, unconventional solutions. *Science* 340:559-561.2013).
- Zhang X, Liu S, Guo C, Zong J, Sun MZ (The association of annexin A2 and cancers. *Clin Transl Oncol* 14:634-640.2012).
- Zhao WQ, Lu B (Expression of annexin A2 in GABAergic interneurons in the normal rat brain. *J Neurochem* 100:1211-1223.2007).
- Zhao WQ, Waisman DM, Grimaldi M (Specific localization of the annexin II heterotetramer in brain lipid raft fractions and its changes in spatial learning. *J Neurochem* 90:609-620.2004).
- Zhao Y, Sudol M, Hanafusa H, Krueger J (Increased tyrosine kinase activity of c-Src during calcium-induced keratinocyte differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:8298-8302.1992).
- Zheng L, Foley K, Huang L, Leubner A, Mo G, Olino K, Edil BH, Mizuma M, Sharma R, Le DT, Anders RA, Illei PB, Van Eyk JE, Maitra A, Laheru D, Jaffee EM (Tyrosine 23 phosphorylation-dependent cell-surface localization of annexin A2 is required for invasion and metastases of pancreatic cancer. *PLoS One* 6:e19390.2011).
- Zhu D, Xiong WC, Mei L (Lipid rafts serve as a signaling platform for nicotinic acetylcholine receptor clustering. *J Neurosci* 26:4841-4851.2006).
- Zobiack N, Gerke V, Rescher U (Complex formation and submembranous localization of annexin 2 and S100A10 in live HepG2 cells. *FEBS Lett* 500:137-140.2001).
- Zobiack N, Rescher U, Laarmann S, Michgehl S, Schmidt MA, Gerke V (Cell-surface attachment of pedestal-forming enteropathogenic *E. coli* induces a clustering of raft components and a recruitment of annexin 2. *J Cell Sci* 115:91-98.2002).
- Zobiack N, Rescher U, Ludwig C, Zeuschner D, Gerke V (The annexin 2/S100A10 complex controls the distribution of transferrin receptor-containing recycling endosomes. *Mol Biol Cell* 14:4896-4908.2003).

# **Annexes**

# Annexes

## Annexe 1

Gabel M, Chasserot-Golaz S (2016) Annexin A2, an essential partner of the exocytotic process in chromaffin cells. J Neurochem. 2016 Jun;137(6):890-6. doi: 10.1111/jnc.13628.

## Annexe 2

SNE Impact 2015 - Société de Neuroendocrinologie

## Annexe 3

Brève CNRS du 23/09/2015 - Un nouveau rôle pour le cytosquelette d'actine au cours de la sécrétion neuroendocrine.

## Annexe 4

Highlights de l'article Annexin A2-dependent actin bundling promotes secretory granule docking to the plasma membrane and exocytosis.

# **Annexe 1**

## REVIEW

## Annexin A2, an essential partner of the exocytotic process in chromaffin cells

Marion Gabel and Sylvette Chasserot-Golaz

INCI, UPR3212 CNRS, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

**Abstract**

Annexin A2 is a calcium-, actin-, and lipid-binding protein implicated in exocytosis in different cell types, such as neuroendocrine cells. In chromaffin cells, cytosolic annexin A2 is recruited to the plasma membrane upon cell stimulation. Here, we review the latest evidence detailing the functional importance of annexin A2 in different stages of exocytosis. These include the recruitment of annexin A2 to the plasma membrane near soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor complexes, the role of annexin

A2 in the formation of lipid domains at exocytotic sites, and finally the annexin A2 bundling of actin microfilaments associated with chromaffin granules. These structures induce first the coalescence of lipid domains required for the formation of the exocytotic site, and in the second time, exert mechanical force on the granule to favor fusion pore expansion and squeeze the granule to facilitate catecholamine release.

**Keywords:** actin, annexin A2, chromaffin cells, exocytosis, lipid domains.

*J. Neurochem.* (2016) **137**, 890–896.

[This article is part of a mini review series on Chromaffin cells \(ISCCB Meeting, 2015\).](#)

Exocytosis of vesicular contents through the fusion of secretory granules with the plasma membrane is a fundamental process involved in many cellular functions, such as cell migration, wound repair, neurotransmission, and hormone secretion. In neuroendocrine cells and neurons, many molecular players that orchestrate secretory vesicle recruitment, docking and fusion with the plasma membrane during Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis have been identified (Jahn and Fasshauer 2012). The functional characteristics of the exocytotic site that ensure vesicle docking to specific active membrane areas and the assembly of the exocytotic machinery remain poorly understood. However, some results suggest the occurrence of an unknown regulated mechanism responsible for lipid segregation and clustering to create exocytotic sites (Ammar *et al.* 2013).

Annexin A2 belongs to a family of structurally related calcium (Ca<sup>2+</sup>)-actin- and phospholipid-binding proteins that are widely expressed in eukaryotic cells. Annexins reversibly bind to a number of cell membrane components, as well as the actin cytoskeleton. Annexins are involved in many essential cellular processes in particular membrane traffic associated with exocytosis, endocytosis, mitotic signaling, and cytoskeleton rearrangements via the second messenger, Ca<sup>2+</sup> (Creutz 1992; Gerke *et al.* 2005). Annexin A2 is one of the best characterized members of this family. Structurally, the form of annexin A2 is a slightly curved disk

with a concave and convex side. Ca<sup>2+</sup>, phospholipid binding and membrane attachment sites are on the convex side, whereas the amino- and carboxyl-terminal extremities are on the opposite concave side facing the cytosol (Bharadwaj *et al.* 2013). Annexin A2 is a peculiar protein because it binds to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) with high affinity (Rescher *et al.* 2004) and has the capacity to form a heterotetrameric complex (p90) coupled with the S-100-related protein, S100A10. In the complex, the S100A10 dimer links two annexin A2 chains in a very symmetrical manner, creating a scaffold able to bridge opposing membranes and actin filaments (Lewit-Bentley *et al.* 2000). Initially, S100A10 was thought to be just a structural component of the annexin A2-S100A10 complex, but it is now considered as a direct and active regulator of many cellular proteins (Svenningsson and Greengard 2007). The

Received January 12, 2016; revised manuscript received March 9, 2016; accepted March 30, 2016.

Address correspondence and reprint requests to Dr Sylvette Chasserot-Golaz, INCI, UPR3212 CNRS, Université de Strasbourg, 5 rue Blaise Pascal, Strasbourg F-67084, France. E-mail: chasserot@inci-cnrs.unistra.fr

**Abbreviations used:** Ca<sup>2+</sup>, calcium; GM1, monosialotetrahexosylganglioside; PIP<sub>2</sub>, phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate; PKC, protein kinase C; SNARE, soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor; VAMP2, vesicle-associated membrane protein 2.

binding of S100A10 to annexin A2 modulates several functions of annexin A2, endowing distinct biochemical properties to the monomer and the heterotetramer of annexin A2. For example, the binding of S100A10 to annexin A2 reduces the  $\text{Ca}^{2+}$  dependency of the annexin A2 interaction with membranes from millimolar to micromolar levels of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  (Waisman 1995). More recently, it has been proposed that the annexin A2 associated with S100A10 complex can form octamers on the cytosolic face of the plasma membrane (Schulz *et al.* 2007).

The implication of annexin A2 in the exocytotic process has been extensively researched because it interacts with two major actors of this process: lipids (PIP<sub>2</sub>, phosphatidylserine) and F-actin. Quick-freeze, deep-etch electron microscopy has revealed that annexin A2 cross-links secretory granules to the plasma membrane in stimulated neuroendocrine cells (Nakata *et al.* 1990; Senda *et al.* 1994). Addition of exogenous annexin A2 restores the secretion lost in permeabilized chromaffin cells stimulated by  $\text{Ca}^{2+}$  (Sarafian *et al.* 1991; Ali *et al.* 1989). This effect is specific for annexin A2 because other annexins present in chromaffin cells (A1, A4, A6) are unable to restore secretion. In addition, the tetramer is more efficient than the monomeric and phosphorylation of annexin A2 by protein kinase C (PKC) is required to promote the binding of cytosolic annexin A2 to cellular membranes (Sarafian *et al.* 1991). More recent data highlighted in this review provide new insights into the functional importance of annexin A2 in different stages of exocytosis.

### The translocation of annexin A2 at the plasma membrane is essential to exocytosis

In bovine chromaffin cells, annexin A2 is distributed throughout the cytoplasm, whereas S100A10 is associated with the subplasmalemmal region. The entry of  $\text{Ca}^{2+}$  following stimulation triggers the translocation of annexin A2 to the plasma membrane. Furthermore, microinjection of a synthetic peptide of annexin A2, corresponding to the amino-terminal sequence which contains the PKC phosphorylation site, completely blocks both this annexin A2 recruitment and inhibits catecholamine release stimulated by nicotine (Chasserot-Golaz *et al.* 1996).

The first direct evidence of the involvement for annexin A2 in catecholamine secretion was obtained using molecular tools in living bovine chromaffin cells (Chasserot-Golaz *et al.* 2005). The expression of endogenous annexin A2 in chromaffin cells was modified using two recombinant viruses: one containing an antisense sequence of annexin A2 designed to knockdown the endogenous protein, and another encoding an annexin A2/S100A10 chimera (XM) that aggregates cytosolic annexin A2 (Harder and Gerke 1993). Both knocking down endogenous annexin A2 and aggregating annexin A2 in the cytosol with these constructs

impaired annexin A2 translocation to the plasma membrane and inhibited catecholamine release. These data indicate that annexin A2 recruitment at the plasma membrane is essential for exocytosis in chromaffin cells. In contrast, another study reported that XM expressed in a stably transfected PC12 cell line does not inhibit exocytosis (Graham *et al.* 1997). Nevertheless, it should be noted that the endogenous annexin A2 level is very high in PC12 cells, and thus the endogenous non-aggregated pool of annexin A2 may have been sufficient to maintain exocytotic activity.

This  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent translocation of annexin A2 to the cell periphery provides a mechanistic spatial link between the activation of cell surface receptors,  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and exocytotic sites. However, in permeabilized chromaffin cells, which offer the opportunity to control the ionic composition of the cytoplasm, the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of annexin A2 translocation has been reported to differ between adrenergic and noradrenergic cells (Sontag *et al.* 1988). Annexin A2 translocates in both phenotypes, but adrenergic chromaffin cells display a higher  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity, responding to a 10-fold lower concentration of  $\text{Ca}^{2+}$ . This increased sensitivity may be a consequence of the formation of the annexin A2 tetramer in adrenergic cells (Waisman 1995).

### S100A10 is the prime anchor of annexin A2 in adrenergic chromaffin cells

In many cell types, S100A10 which is located on the cytoplasmic face of the plasma membrane, is the intracellular docking ligand of annexin A2 (Osborn *et al.* 1988). S100A10 is the most divergent member of the S100 protein family because its conformation is insensitive to calcium. S100A10 is permanently in a 'Ca<sup>2+</sup>- on' state, as an anti-parallel, packed, non-covalent homodimer, even in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  (Rety *et al.* 1999). Depending on the cell type, S100A10 targets annexin A2 to the cortical cytoskeleton (Donato 2001) or mediates the recruitment of annexin A2 to the cell surface (Deora *et al.* 2004), suggesting that S100A10 is actively implicated in mobilizing annexin A2 for specific functions.

In bovine chromaffin cells, S100A10 is selectively expressed by a subpopulation: the adrenergic cells, where S100A10 is present in the subplasmalemmal region of both unstimulated and stimulated cells. Subcellular fractionation experiments have confirmed that S100A10 is present in the Triton X-100 insoluble fraction from both unstimulated and stimulated cells, while annexin A2 switches from the cytosolic fraction to the Triton X-100 insoluble fraction after stimulation. This implies that S100A10 may well be the target protein which recruits annexin A2 in stimulated adrenergic chromaffin cells. Co-localization of both proteins in the cell periphery of these cells, and cross-linking experiments performed on permeabilized chromaffin cells provide further evidence that cell stimulation induces

formation of the annexin A2 tetramer, and that S100A10 is the docking ligand for annexin A2 in adrenergic cells (Umbrecht-Jenck *et al.* 2010). Furthermore, the presence of S100A10 uniquely in adrenergic cells may explain why less  $\text{Ca}^{2+}$  is required for the translocation of annexin A2 and to trigger exocytosis in these cells compared with noradrenergic cells (Chasserot-Golaz *et al.* 1996).

The absence of S100A10 in noradrenergic cells raises the question of what targets annexin A2 to subplasmalemmal region in these cells. Since annexin A2 binds to phospholipids in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner, it may well interact directly with the lipid bilayer in stimulated noradrenergic cells. Another possibility is the recruitment of annexin A2 by a S100-related protein expressed in noradrenergic chromaffin cells. There are several possible candidates: S100A11 binds to annexin A2 at an equivalent rate to that observed for certain membrane fusion processes (Rintala-Dempsey *et al.* 2006); S100A6 participates in the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent exocytosis in other secretory cell types (Timmons *et al.* 1993) and S100A4 (Sandelin *et al.* 2004). The impact of these S100-related proteins on annexin A2 translocation and secretion in noradrenergic chromaffin cells needs to be explored.

### Annexin A2 is functionally linked to SNARE proteins regulating catecholamine secretion

The recruitment of annexin A2 to SNAP receptor [soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE)] clusters may be pivotal for the spatiotemporal coordination of exocytosis in chromaffin cells. The localization of S100A10 in the cell periphery of adrenergic chromaffin cells provides an ideal candidate for positioning annexin A2 close by SNARE proteins that mediate granule docking and fusion.

S100A10 has sequence homology with calmodulin (Santamaria-Kisiel *et al.* 2006) and like calmodulin (Quetglas *et al.* 2002), S100A10 is capable to bind the SNARE protein, synaptobrevin 2 (VAMP2) which is associated with the plasma membrane of adrenergic cells (Umbrecht-Jenck *et al.* 2010). When VAMP2 is cleaved by tetanus toxin, S100A10 becomes cytosolic, and the targeting of annexin A2 to the plasma membrane is inhibited. Furthermore, immunogold electron microscopy of plasma membrane sheets has confirmed the existence of domains where S100A10, VAMP2, and syntaxin are concentrated in unstimulated cells and that annexin A2 translocates to these clusters following stimulation (Umbrecht-Jenck *et al.* 2010). Interestingly, syntaxin1/SNAP25 clusters have previously been proposed to spatially and temporally define exocytotic activity in chromaffin cells (Lopez *et al.* 2007). These data suggest that in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$ , S100A10 maintains VAMP2 at the plasma membrane and prevents its internalization (Sampo *et al.* 2003), and that the increase in  $\text{Ca}^{2+}$  targets annexin A2 near to VAMP2,

thereby coupling S100A10/annexin A2 and SNARE complexes to promote exocytosis.

In addition, S100A10 may directly regulate the formation of SNARE complexes. The binding of S100A10 to VAMP2 may inhibit the formation of SNARE cis complexes in the plasma membrane and therefore favor trans complexes association between plasma and granule membranes during the exocytotic process. Along this line, by inhibiting phospholipase A<sub>2</sub> (Wu *et al.* 1997; Bailleux *et al.* 2004), S100A10 could decrease the production of arachidonic acid in the vicinity of SNAREs proteins in order to facilitate the structural changes required for the interaction of syntaxin with SNAP25 (Connell *et al.* 2007). In this way, S100A10 would be a working partner for SNAREs in the exocytotic molecular machinery.

In noradrenergic cells, the lack of S100A10 implies that the recruitment of annexin A2 to the SNARE complexes results by an alternative mechanism. One possibility is that annexin A2 is recruited directly by a SNAP25 homolog, either SNAP23 or one of the SNAP25 isoforms which are differentially expressed in bovine chromaffin cells (Grant *et al.* 1999). The interaction of annexin A2 with SNAP23 has been described to act as a  $\text{Ca}^{2+}$  sensor and/or favors fusion in the secretion of surfactant by alveolar type II cells (Wang *et al.* 2007). Such an interaction may function similarly for catecholamine secretion by noradrenergic cells.

### Annexin A2 participates in the organization of lipid domains at exocytotic sites

In the plasma membrane of several cell types, annexin A2 binds in a preferential manner to specific lipid domains, the so-called rafts, enriched in cholesterol, glycosphingolipids, and glycosylphosphatidylinositol- anchored proteins (Gerke *et al.* 2005). As mentioned above, upon stimulation, the recruitment of annexin A2 to the cell periphery is accompanied by an augmentation of this protein in the Triton X-100-insoluble fraction containing cytoskeleton and rafts (Chasserot-Golaz *et al.* 1996; Sagot *et al.* 1997). The capacity of annexin A2 to promote lipid microdomain formation, both *in vivo* and *in vitro* (Gerke *et al.* 2005; Drucker *et al.* 2013), combined with the association of SNARE complexes with domains enriched in cholesterol (Chamberlain *et al.* 2001; Lang 2007) suggest that annexin A2 influences raft dynamics during exocytosis.

Using fluorescent cholera toxin to visualize monosialotetrahexosylganglioside (GM1)-containing microdomains (Janes *et al.* 1999), only a faint staining is observed at the surface of resting/unstimulated chromaffin cells, whereas the binding of fluorescent cholera toxin significantly increases at exocytotic sites following nicotine stimulation. This increase is not because of *de novo* synthesis of GM1, in view of the rapidity in which the cholera toxin labeling appears, and in

addition, similar amounts of GM1 are found in subcellular fractions prepared from cells before and after stimulation. Thus, the increase in cholera toxin binding probably reflects the coalescence of GM1 nanodomains into bigger domains because this aggregation of GM1 molecules provokes the binding of the pentavalent toxin with a higher affinity (Arosio *et al.* 2004). Immunogold electron microscopy on native plasma membrane sheets confirmed this hypothesis. In unstimulated cells, GM1 is uniformly dispersed in small clusters, whereas in nicotine-stimulated cells, GM1 is found in larger clusters near docked granules (Gabel *et al.* 2015).

The contribution of annexin A2 to the formation of lipid domains in stimulated chromaffin cells is supported by the fact that annexin A2 translocation precedes raft formation and catecholamine secretion. As well the annexin A2 recruitment to the plasma membrane correlates with the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent formation of GM1-containing domains and exocytosis (Chasserot-Golaz *et al.* 2005). Moreover, cholesterol which enhances the membrane-binding affinity of annexin A2 may facilitate the annexin A2-mediated formation and stabilization of these domains. This annexin A2 triggered coalescence of such lipid domains may be determinant in defining the timing and site where the exocytotic machinery is assembled.

In stimulated chromaffin cells, annexin A2 is associated with SNARE clusters and concomitantly  $\text{PIP}_2$  microdomains are formed at granule docking sites on the plasma membrane (Umbrecht-Jenck *et al.* 2010). Although  $\text{PIP}_2$  is a minor constituent of the lipid bilayer, there is abundant evidence that  $\text{PIP}_2$  domains are necessary for effective docking and fusion of granules with the plasma membrane mediated by SNARE complexes (Lang *et al.* 2001; Ohara-Imaizumi *et al.* 2004; Sieber *et al.* 2006; Lang 2007). Furthermore, the local synthesis of  $\text{PIP}_2$  is probably slower than its lateral diffusion in the plasma membrane, and thus  $\text{PIP}_2$  clustering most likely depends on diffusion barriers determined by cytoskeleton and  $\text{PIP}_2$ -binding proteins. Annexin A2 possesses the biophysical characteristics necessary for forming  $\text{PIP}_2$  domains in the plasma membrane (Rescher *et al.* 2004), as well as the GM1-cholesterol enriched domains, described above. Thus, an attractive hypothesis is that annexin A2 stabilizes  $\text{PIP}_2$  clusters nearby syntaxin-1, which in turn recruit specific  $\text{PIP}_2$ -binding proteins that participate in the docking step (Martin 2015).

The fact that annexin A2 is a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protein recruited to the plasma membrane following a rise in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  is an attractive element to account for  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of the  $\text{PIP}_2$ -SNARE cluster formation. The existence of a relationship between annexin A2 at the plasma membrane and the formation of  $\text{PIP}_2$  domains is supported by recent evidence that Tat, an HIV-1 viral protein that binds  $\text{PIP}_2$  at the plasma membrane inhibits both annexin A2 translocation and neurosecretion in neuroendocrine cells (Tryoen-Toth *et al.* 2013).

### Annexin A2 bundles actin filaments to form lipid domains at exocytotic sites

How might annexin A2 promote lipid domains in stimulated cells? There are two possible mechanisms which might act in concert. Annexin A2 could induce lipid clustering because *in vitro* data indicate a direct  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent interaction between annexin A2 and lipids, either by homophilic lateral interactions or by binding to negatively charged phospholipids and phosphoinositides (Drucker *et al.* 2013, 2014). However, this has yet to be demonstrated *in vivo*. The second mechanism involves an annexin A2 reorganization of actin filaments underlying lipid domains in the plasma membrane. The actin cytoskeleton has a scaffold role in domain formation. For example, actin filaments are increased nearby lipid domains and lipid domains are decreased when actin polymerization is disrupted (Dinic *et al.* 2013).

The importance of annexin A2 bundling of actin filaments for lipid domain organization during exocytosis has recently been described (Gabel *et al.* 2015). Electron tomography shows that actin bundles connect docked chromaffin granules to the plasma membrane and contribute to the formation of GM1-enriched domains at exocytotic sites. These filamentous structures could correspond to the fine strands that cross-link the granule on plasma membrane sheets previously shown by quick-freeze, deep-etch electron microscopy (Nakata *et al.* 1990). These results offer solid proof of the molecular link between annexin A2, actin cytoskeleton, and secretory granules. In addition, the expression of an annexin A2 mutant with impaired actin-bundling activity not only inhibited the formation of lipid domains in plasma membrane but also decreased the number of exocytotic events and slowed fusion dynamics. On the other hand, the opposite effects were observed when the intrinsic actin-bundling activity of endogenous annexin A2 was pharmacologically enhanced. Taken together, this indicates that annexin A2 is crucial for remodeling actin-driven membrane rearrangements that are essential for the generation of operational exocytotic sites (Gabel *et al.* 2015).

Additionally, these results support the notion that the F-actin cytoarchitecture regulates different steps of the secretory machinery in order to coordinate exocytosis in neuroendocrine cells (Gutierrez 2012). Firstly, actin regulated by  $\text{PIP}_2$  (Wen *et al.* 2011) and in association with myosins, plays an active role in the transport, tethering, and guiding of secretory granules to their fusion site (Papadopoulos *et al.* 2015, Tomatis *et al.* 2013). Secondly, annexin A2-mediated actin bundles may promote docking by creating the specific lipid environment required for SNARE complex formation and/or stabilizing granules captured by minimal tethering machinery to prevent them from rapidly undocking (Toonen *et al.* 2006). Finally, actin filaments bundled by annexin A2 seem to control fusion pore opening and the release of secretory granule contents. In non-neuronal cell

types, contraction of the actin coating granules along with myosin II have been proposed to compress fused granules for active extrusion of non-soluble, bulky granular contents (Miklavc *et al.* 2012). In chromaffin cells, inhibition of myosin II slows down fusion (Berberian *et al.* 2009). Thus, to some extent, annexin A2 seems to act similar to myosin II. However, annexin A2 actin-bundling activity also affected the characteristics of the early fusion pore, a role that has not been proposed for myosin II (Berberian *et al.* 2009).

In view of its dual capacity to bundle F-actin and to cluster PIP<sub>2</sub> in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner (Rescher *et al.* 2004; Umbrecht-Jenck *et al.* 2010), annexin A2 is emerging as a key player to spatially coordinate oscillating concentrations of PIP<sub>2</sub> and cortical F-actin during exocytosis.

### Annexin A2 regulation during exocytosis

Phosphorylation is an important post-translational modification that controls the activity and functions of annexin A2 during exocytosis. The amino-terminal domain of annexin A2 contains both tyrosine and serine phosphorylation sites and a reactive cysteine (Bharadwaj *et al.* 2013). Nicotine stimulation of chromaffin cells has been shown to activate PKC which phosphorylates the serine 25 (Ser 25) site, and also induces exocytosis (Sarafian *et al.* 1991). However, Ser 25 phosphorylation of the annexin A2 tetramer *in vitro* inhibits its capacity to aggregate lipid vesicles without altering its binding to these vesicles (Regnoui *et al.* 1995). These apparently contradictory results may imply that during exocytosis, annexin A2 may need to be phosphorylated and then dephosphorylated, as it has been recently described for the secretion of von Willebrand factor from endothelial cells (Brandherm *et al.* 2013).

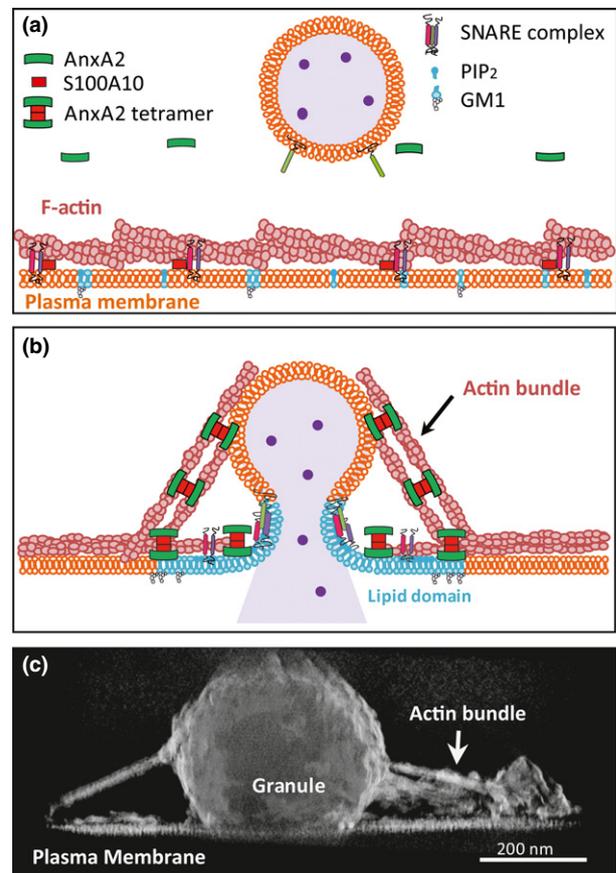
Another crucial phosphorylation site is tyrosine 23. Phosphorylation of this residue *in vitro* decreases annexin A2 binding to F-actin, and to phospholipid vesicles at low Ca<sup>2+</sup> concentrations (Rescher *et al.* 2008). The functional importance of this phosphorylation during exocytosis in chromaffin cells has not yet been investigated.

### Conclusions and perspectives

Based on these results, we propose the following model (Fig. 1). In unstimulated adrenergic cells (Fig. 1a), annexin A2 is cytosolic and S100A10 is bound to VAMP2 at the plasma membrane. PIP<sub>2</sub> and GM1 are randomly distributed in the plasma membrane. Upon stimulation (Fig. 1b), annexin A2 translocates to the plasma membrane close to SNARE complexes because of its recruitment by S100A10. This leads to formation of the tetramer in the cell periphery. Next, annexin A2 bundles actin to constraint the lateral mobility of the newly formed lipid domains, thereby increasing their stability. This compartmentalization of the plasma membrane serves to spatially and temporally organize

proteins required for docking and fusion, and may be crucial for the speed and accuracy of the exocytotic process. The actin coating granules and the actin bundles which connect granules to the plasma membrane may also exert a mechanical force to compress granules and favor release of their contents. This schema correlates well with the 3D architecture of a docked secretory granule obtained from tomographic slices (Fig. 1c). As the annexin A2 tetramer has a higher Ca<sup>2+</sup> sensibility and higher affinity for PIP<sub>2</sub> than the annexin A2 monomer has (Gokhale *et al.* 2005), annexin A2 could determine the lipid composition essential to form operating exocytotic sites specific for each catecholaminergic phenotypes. The details of how this occurs in noradrenergic cells remains to be elucidated.

Altogether, this scheme suggests that AnxA2 and actin could act by triggering the coalescence of lipid rafts required for the recruitment and/or activation of the exocytotic machinery at the right time and place. Understanding the precise mechanisms by which annexin A2-generated actin



**Fig. 1** Model of the role of annexin A2 during exocytosis. Schematic drawing of annexin A2 and S100A10 localization in unstimulated (a) and stimulated chromaffin cells (b). (c) Side view of the isosurface representation of a docked granule tomogram. The actin cytoskeleton favoring exocytosis of secretory granules is clearly linked to the plasma membrane through specific associated membrane structures.

bundles contribute to the docking machinery and thereby accelerate vesicle fusion is clearly the next challenge.

To conclude, annexin A2 plays a central role in neuroendocrine secretion, coordinating both spatially and temporally lipid microdomain formation and actin filament remodeling necessary for granule recruitment, efficient fusion, and granule cargo release. The annexin A2-dependent lipid microdomain organization is not only important for cellular trafficking but also for many fundamental cellular processes dependent on membrane dynamics ranging from differentiation to migration (Hitchcock *et al.* 2014).

### Acknowledgments and conflict of interest disclosure

We thank Dr Nancy Grant for helpful discussions and crucial reading of the manuscript. The authors declare have no conflict of interest.

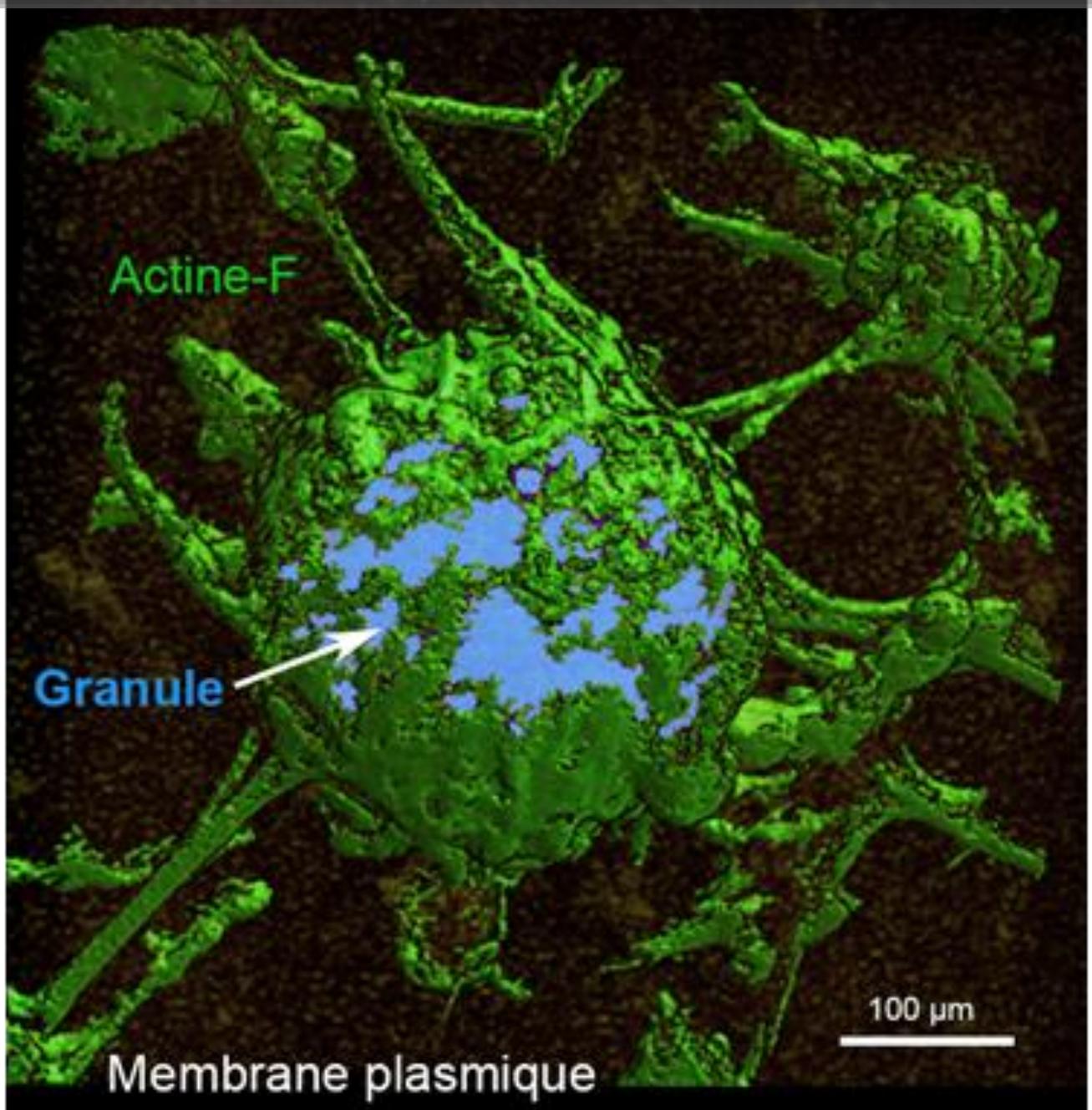
### References

- Ali S. M., Geisow M. J. and Burgoyne R. D. (1989) A role for calpactin in calcium-dependent exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Nature* **340**, 313–315.
- Ammar M. R., Kassas N., Chasserot-Golaz S., Bader M. F. and Vitale N. (2013) Lipids in regulated exocytosis: what are they doing? *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **4**, 125.
- Arosio D., Vrasidas I., Valentini P., Liskamp R. M., Pieters R. J. and Bernardi A. (2004) Synthesis and cholera toxin binding properties of multivalent GM1 mimics. *Org. Biomol. Chem.* **2**, 2113–2124.
- Bailleux A., Wendum D., Audubert F., Jouniaux A. M., Koumanov K., Trugnan G. and Masliah J. (2004) Cytosolic phospholipase A2-p11 interaction controls arachidonic acid release as a function of epithelial cell confluence. *Biochem. J.* **378**, 307–315.
- 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**, 863–870.
- Bharadwaj A., Bydoun M., Holloway R. and Waisman D. (2013) Annexin A2 heterotetramer: structure and function. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 6259–6305.
- Brandherm I., Disse J., Zeuschner D. and Gerke V. (2013) cAMP-induced secretion of endothelial von Willebrand factor is regulated by a phosphorylation/dephosphorylation switch in annexin A2. *Blood* **122**, 1042–1051.
- Chamberlain L. H., Burgoyne R. D. and Gould G. W. (2001) SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 5619–5624.
- Chasserot-Golaz S., Vitale N., Sagot I., Delouche B., Dirrig S., Pradel L. A., Henry J. P., Aunis D. and Bader M. F. (1996) Annexin II in exocytosis: catecholamine secretion requires the translocation of p36 to the subplasmalemmal region in chromaffin cells. *J. Cell Biol.* **133**, 1217–1236.
- 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.
- Connell E., Darios F., Broersen K., Gatsby N., Peak-Chew S. Y., Rickman C. and Davletov B. (2007) Mechanism of arachidonic acid action on syntaxin-Munc18. *EMBO Rep.* **8**, 414–419.
- Creutz C. E. (1992) The annexins and exocytosis. *Science* **258**, 924–931.
- Deora A. B., Kreitzer G., Jacovina A. T. and Hajjar K. A. (2004) An annexin 2 phosphorylation switch mediates p11-dependent translocation of annexin 2 to the cell surface. *J. Biol. Chem.* **279**, 43411–43418.
- Dinic J., Ashrafzadeh P. and Parmryd I. (2013) Actin filaments attachment at the plasma membrane in live cells cause the formation of ordered lipid domains. *Biochim. Biophys. Acta* **1828**, 1102–1111.
- Donato R. (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **33**, 637–668.
- Drucker P., Pejic M., Galla H. J. and Gerke V. (2013) Lipid segregation and membrane budding induced by the peripheral membrane binding protein annexin A2. *J. Biol. Chem.* **288**, 24764–24776.
- Drucker P., Pejic M., Grill D., Galla H. J. and Gerke V. (2014) Cooperative binding of annexin A2 to cholesterol- and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-containing bilayers. *Biophys. J.* **107**, 2070–2081.
- Gabel M., Delavoie F., Demais V., Royer C., Bailly Y., Vitale N., Bader M. F. and Chasserot-Golaz S. (2015) Annexin A2-dependent actin bundling promotes secretory granule docking to the plasma membrane and exocytosis. *J. Cell Biol.* **210**, 785–800.
- Gerke V., Creutz C. E. and Moss S. E. (2005) Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 449–461.
- 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**, 42831–42840.
- Graham M. E., Gerke V. and Burgoyne R. D. (1997) Modification of annexin II expression in PC12 cell lines does not affect Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis. *Mol. Biol. Cell* **8**, 431–442.
- Grant N. J., Hepp R., Krause W., Aunis D., Oehme P. and Langley K. (1999) Differential expression of SNAP-25 isoforms and SNAP-23 in the adrenal gland. *J. Neurochem.* **72**, 363–372.
- Gutierrez L. M. (2012) New insights into the role of the cortical cytoskeleton in exocytosis from neuroendocrine cells. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* **295**, 109–137.
- Harder T. and Gerke V. (1993) The subcellular distribution of early endosomes is affected by the annexin IIp11(2) complex. *J. Cell Biol.* **123**, 1119–1132.
- Hitchcock J. K., Katz A. A. and Schafer G. (2014) Dynamic reciprocity: the role of annexin A2 in tissue integrity. *J. Cell Commun. Signal.* **8**, 125–133.
- Jahn R. and Fasshauer D. (2012) Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature* **490**, 201–207.
- Janes P. W., Ley S. C. and Magee A. I. (1999) Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J. Cell Biol.* **147**, 447–461.
- Lang T. (2007) SNARE proteins and ‘membrane rafts’. *J. Physiol.* **585**, 693–698.
- Lang T., Bruns D., Wenzel D., Riedel D., Holroyd P., Thiele C. and Jahn R. (2001) SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO J.* **20**, 2202–2213.
- Lewit-Bentley A., Rety S., de Sopkova- Oliveira Santos J. and Gerke V. (2000) S100-annexin complexes: some insights from structural studies. *Cell Biol. Int.* **24**, 799–802.
- 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**, 547–558.

- Martin T. F. (2015) PI(4,5)P(2)-binding effector proteins for vesicle exocytosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1851**, 785–793.
- Miklavc P., Hecht E., Hobi N., Wittekindt O. H., Dietl P., Kranz C. and Frick M. (2012) Actin coating and compression of fused secretory vesicles are essential for surfactant secretion—a role for Rho, formins and myosin II. *J. Cell Sci.* **125**, 2765–2774.
- Nakata T., Sobue K. and Hirokawa N. (1990) Conformational change and localization of calpactin I complex involved in exocytosis as revealed by quick-freeze, deep-etch electron microscopy and immunocytochemistry. *J. Cell Biol.* **110**, 13–25.
- Ohara-Imaizumi M., Nishiwaki C., Kikuta T., Kumakura K., Nakamichi Y. and Nagamatsu S. (2004) Site of docking and fusion of insulin secretory granules in live MIN6 beta cells analyzed by TAT-conjugated anti-syntaxin 1 antibody and total internal reflection fluorescence microscopy. *J. Biol. Chem.* **279**, 8403–8408.
- Osborn M., Johnsson N., Wehland J. and Weber K. (1988) The submembranous location of p11 and its interaction with the p36 substrate of pp60 src kinase in situ. *Exp. Cell Res.* **175**, 81–96.
- Papadopoulos A., Gomez G. A., Martin S., Jackson J., Gormal R. S., Keating D. J., Yap A. S. and Meunier F. A. (2015) Activity-driven relaxation of the cortical actomyosin II network synchronizes Munc18-1-dependent neurosecretory vesicle docking. *Nat. Commun.* **6**, 6297.
- Quetglas S., Iborra C., Sasakawa N., De Haro L., Kumakura K., Sato K., Leveque C. and Seagar M. (2002) Calmodulin and lipid binding to synaptobrevin regulates calcium-dependent exocytosis. *EMBO J.* **21**, 3970–3979.
- Regnouf F., Sagot I., Delouche B., Devilliers G., Cartaud J., Henry J. P. and Pradel L. A. (1995) “In vitro” phosphorylation of annexin 2 heterotetramer by protein kinase C. Comparative properties of the unphosphorylated and phosphorylated annexin 2 on the aggregation and fusion of chromaffin granule membranes. *J. Biol. Chem.* **270**, 27143–27150.
- Rescher U., Ruhe D., Ludwig C., Zobiack N. and Gerke V. (2004) Annexin 2 is a phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate binding protein recruited to actin assembly sites at cellular membranes. *J. Cell Sci.* **117**, 3473–3480.
- Rescher U., Ludwig C., Konietzko V., Kharitonov A. and Gerke V. (2008) Tyrosine phosphorylation of annexin A2 regulates Rho-mediated actin rearrangement and cell adhesion. *J. Cell Sci.* **121**, 2177–2185.
- Rety S., Sopkova J., Renouard M., Osterloh D., Gerke V., Tabaries S., Russo-Marie F. and Lewit-Bentley A. (1999) The crystal structure of a complex of p11 with the annexin II N-terminal peptide. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 89–95.
- Rintala-Dempsey A. C., Santamaria-Kisiel L., Liao Y., Lajoie G. and Shaw G. S. (2006) Insights into S100 target specificity examined by a new interaction between S100A11 and annexin A2. *Biochemistry* **45**, 14695–14705.
- Sagot I., Regnouf F., Henry J. P. and Pradel L. A. (1997) Translocation of cytosolic annexin 2 to a Triton-insoluble membrane subdomain upon nicotine stimulation of chromaffin cultured cells. *FEBS Lett.* **410**, 229–234.
- Sampo B., Kaech S., Kunz S. and Banker G. (2003) Two distinct mechanisms target membrane proteins to the axonal surface. *Neuron* **37**, 611–624.
- Sandelin M., Zabihi S., Liu L., Wicher G. and Kozlova E. N. (2004) Metastasis-associated S100A4 (Mts1) protein is expressed in subpopulations of sensory and autonomic neurons and in Schwann cells of the adult rat. *J. Comp. Neurol.* **473**, 233–243.
- Santamaria-Kisiel L., Rintala-Dempsey A. C. and Shaw G. S. (2006) Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *Biochem. J.* **396**, 201–214.
- Sarafian T., Pradel L. A., Henry J. P., Aunis D. and Bader M. F. (1991) The participation of annexin II (calpactin I) in calcium-evoked exocytosis requires protein kinase C. *J. Cell Biol.* **114**, 1135–1147.
- Schulz D. M., Kalkhof S., Schmidt A., Ihling C., Stingl C., Mechtler K., Zschornig O. and Sinz A. (2007) Annexin A2/P11 interaction: new insights into annexin A2 tetramer structure by chemical crosslinking, high-resolution mass spectrometry, and computational modeling. *Proteins* **69**, 254–269.
- Senda T., Okabe T., Matsuda M. and Fujita H. (1994) Quick-freeze, deep-etch visualization of exocytosis in anterior pituitary secretory cells: localization and possible roles of actin and annexin II. *Cell Tissue Res.* **277**, 51–60.
- Sieber J. J., Willig K. I., Heintzmann R., Hell S. W. and Lang T. (2006) The SNARE motif is essential for the formation of syntaxin clusters in the plasma membrane. *Biophys. J.* **90**, 2843–2851.
- Sontag J. M., Aunis D. and Bader M. F. (1988) Peripheral actin filaments control calcium-mediated catecholamine release from streptolysin-O-permeabilized chromaffin cells. *Eur. J. Cell Biol.* **46**, 316–326.
- Svenningsson P. and Greengard P. (2007) p11 (S100A10)—an inducible adaptor protein that modulates neuronal functions. *Curr. Opin. Pharmacol.* **7**, 27–32.
- Timmons P. M., Chan C. T., Rigby P. W. and Poirier F. (1993) The gene encoding the calcium binding protein calyculin is expressed at sites of exocytosis in the mouse. *J. Cell Sci.* **104**, Pt 1, 187–196.
- Tomatis V. M., Papadopoulos A., Malintan N. T., Martin S., Wallis T., Gormal R. S., Kendrick-Jones J., Buss F. and Meunier F. A. (2013) Myosin VI small insert isoform maintains exocytosis by tethering secretory granules to the cortical actin. *J. Cell Biol.* **200**, 301–320.
- Toonen R. F., Kochubey O., de Wit H., Gulyas-Kovacs A., Konijnenburg B., Sorensen J. B., Klingauf J. and Verhage M. (2006) Dissecting docking and tethering of secretory vesicles at the target membrane. *EMBO J.* **25**, 3725–3737.
- Tryoen-Toth P., Chasserot-Golaz S., Tu A., Gherib P., Bader M. F., Beaumelle B. and Vitale N. (2013) HIV-1 Tat protein inhibits neurosecretion by binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Cell Sci.* **126**, 454–463.
- Umbrecht-Jenck E., Demais V., Calco V., Bailly Y., Bader M. F. and Chasserot-Golaz S. (2010) S100A10-mediated translocation of annexin-A2 to SNARE proteins in adrenergic chromaffin cells undergoing exocytosis. *Traffic* **11**, 958–971.
- Waisman D. M. (1995) Annexin II tetramer: structure and function. *Mol. Cell. Biochem.* **149–150**, 301–322.
- Wang P., Chintagari N. R., Gou D., Su L. and Liu L. (2007) Physical and functional interactions of SNAP-23 with annexin A2. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **37**, 467–476.
- Wen P. J., Osborne S. L., Zanin M., et al. (2011) Phosphatidylinositol (4,5)bisphosphate coordinates actin-mediated mobilization and translocation of secretory vesicles to the plasma membrane of chromaffin cells. *Nat. Commun.* **2**, 491.
- Wu T., Angus C. W., Yao X. L., Logun C. and Shelhamer J. H. (1997) P11, a unique member of the S100 family of calcium-binding proteins, interacts with and inhibits the activity of the 85-kDa cytosolic phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* **272**, 17145–17153.

## **Annexe 2**

# SNE Currents 2015

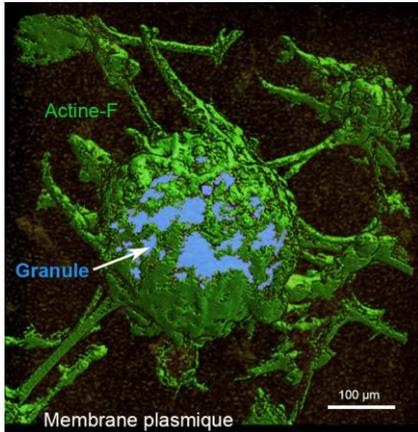


A summary of  
breakthroughs in  
French  
Neuroendocrinology  
in 2015

<https://www.societe-neuroendocrinologie.fr>

<http://www.societe-neuroendocrinologie.fr>

## Actine et annexine A2 : Partenaires essentiels de la sécrétion neuroendocrine



Le système neuroendocrine nécessite une communication cellulaire élaborée dépendante d'un intense trafic membranaire. Ainsi, l'exocytose régulée par le calcium conduit à la libération de molécules informatives telles que des neurotransmetteurs et des hormones, contenues dans des granules de sécrétion. Dans les cellules sécrétrices neuroendocrines, l'arrimage puis la fusion des granules à la membrane plasmique se déroule au niveau de sites spécifiques dédiés à l'exocytose.

L'annexine A2 est l'une des premières protéines identifiées au niveau des sites d'exocytose dans les cellules chromaffines. Elle lie deux acteurs majeurs de l'exocytose, l'actine et les phospholipides pour organiser des domaines lipidiques au sein de la membrane plasmique. La tomographie électronique associée à la mesure de l'exocytose sur cellule unique par ampérométrie montre que la formation de domaines lipidiques au niveau des sites d'exocytose nécessite la fasciculation par l'annexine A2 de filaments d'actine pour former des torons d'actine reliant le granule à la membrane plasmique. Ces faisceaux d'actine participent directement au recrutement et à la fusion des granules à la membrane plasmique. La représentation tridimensionnelle de ces structures d'actine formées par l'annexine A2 au niveau des sites d'exocytose représente une avancée majeure dans la compréhension du mécanisme de la sécrétion neuroendocrine.

**Annexin A2-dependent actin bundling promotes secretory granule docking to the plasma membrane and exocytosis.** Gabel M, Delavoie F, Demais V, Royer C, Bailly Y, Vitale N, Bader MF, Chasserot-Golaz S. *J Cell Biol.* 2015 Aug 31; 210(5): 785-800. doi: 10.1083/jcb.201412030.

## Actin and Annexin A2: Essential Partners of Neuroendocrine Secretion

The neuroendocrine system depends on elaborate cellular communication provided by an intense membrane trafficking. Calcium-regulated exocytosis results in the release of molecules such as neurotransmitters and hormones contained in secretory granules. In neuroendocrine cells, the recruitment and subsequent fusion of secretory granules at the plasma membrane occur at specific sites dedicated to exocytosis.

Annexin A2 is one of the first proteins identified at the exocytotic sites in chromaffin cells. Annexin A2 binds two major actors of exocytosis, actin and phospholipids and can induce specific lipid domains in the plasma membrane. Electron tomography, together with single cell catecholamine release measured by amperometry, shows that the formation of lipid domains at the exocytotic sites requires annexin A2 bundling of actin filaments that connect the granule to the plasma membrane. These actin bundles are involved in the recruitment and fusion steps of exocytosis. The three-dimensional visualization of the actin strands formed by annexin A2 at exocytotic sites represents a major advance in the understanding of neuroendocrine secretion.

## **Annexe 3**

---

## Un nouveau rôle pour le cytosquelette d'actine au cours de la sécrétion neuroendocrine

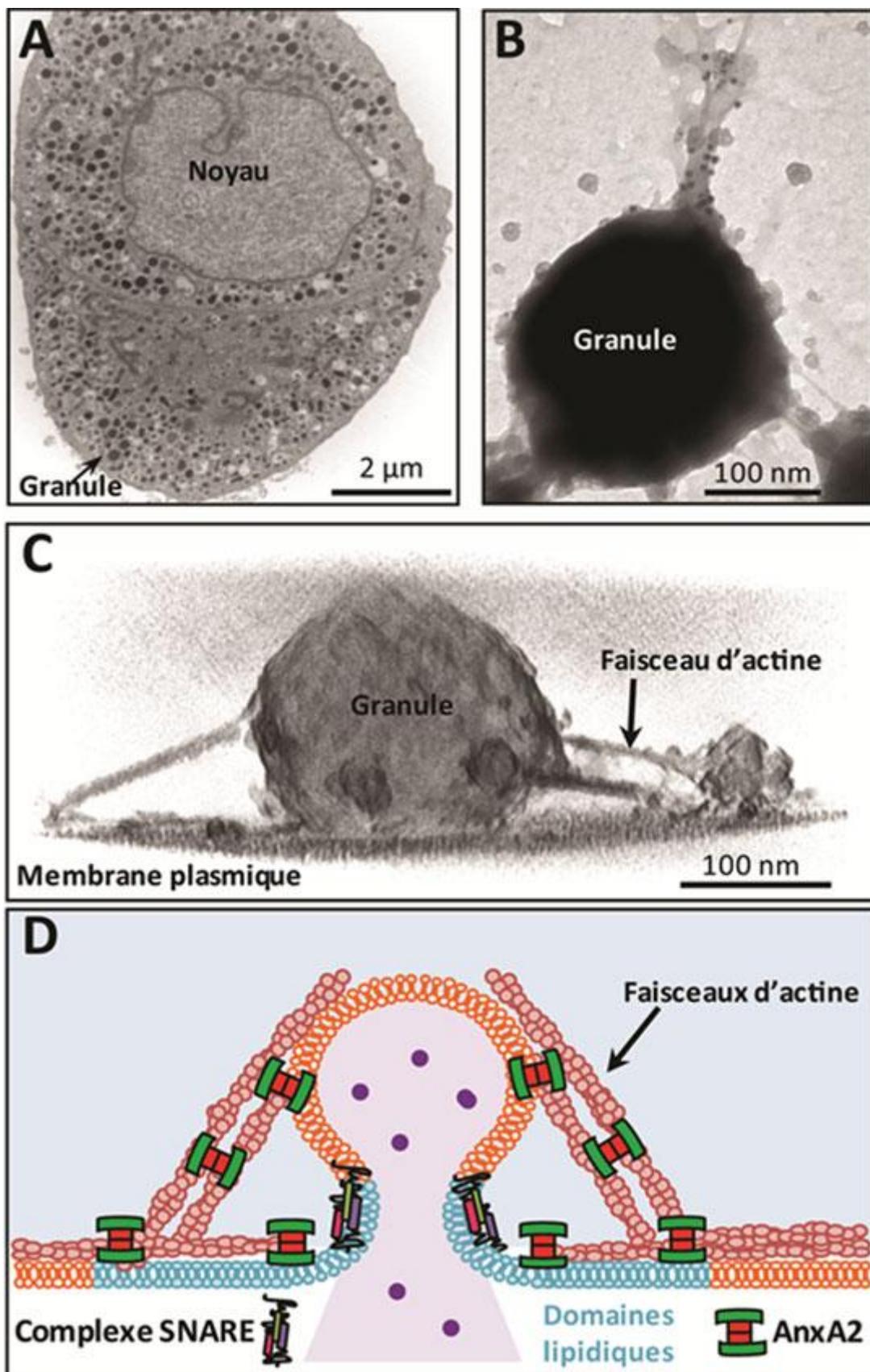
**Le trafic membranaire qui assure le fonctionnement des systèmes nerveux et neuroendocrine nécessite des changements d'organisation de la membrane plasmique et du cytosquelette. Des chercheurs de l'Institut des neurosciences cellulaires et intégratives apportent une contribution majeure à la compréhension de ces processus en révélant que dans les cellules chromaffines, la protéine Annexine A2 forme des faisceaux de filaments d'actine, qui participent à la mise en place de domaines lipidiques spécifiques, nécessaires à l'assemblage des sites d'exocytose et à la fusion des granules de sécrétion avec la membrane plasmique. Cette étude est publiée dans la revue *Journal of Cell Biology*.**

Le fonctionnement des systèmes nerveux et neuroendocrine repose sur une communication cellulaire élaborée, assurée par un trafic membranaire intense dont l'altération provoque de nombreuses pathologies telles que certaines maladies neurodégénératives et des cancers neuroendocriniens. Dans les cellules neuroendocrines, les granules de sécrétion s'arriment à la membrane plasmique au niveau de sites spécifiques de l'exocytose où une étape de fusion entre membranes granulaire et plasmique permet la libération hormonale. Ainsi, l'étude de ces plateformes membranaires et des changements d'organisation de la membrane plasmique nécessaires à la sécrétion neuroendocrine représente un défi majeur en biologie.

L'Annexine A2 fût l'une des premières protéines identifiées au niveau des sites d'exocytose. Cette protéine lie deux acteurs majeurs du processus d'exocytose, l'actine du cytosquelette et les phospholipides qui composent la membrane plasmique. L'Annexine A2 possède également une activité de fasciculation des filaments d'actine. Elle permet, en présence de calcium, l'association de plusieurs filaments en faisceaux d'actine, formant ainsi des complexes membrane-cytosquelette capables de modifier la mobilité des lipides de la membrane plasmique. De nombreuses études ont mis en évidence la présence d'Annexine A2 au niveau des sites d'exocytose mais sa fonction dans les rouages de l'exocytose est restée jusqu'à présent énigmatique. Dans les cellules chromaffines (Fig 1A), les chercheurs ont montré que lors de la sécrétion, l'Annexine A2 est recrutée au voisinage des complexes SNARE responsables de l'arrimage des granules à la membrane plasmique, pour former des radeaux enrichis en lipides de type GM1 et phosphoinositides de type PIP2, nécessaires au recrutement spatio-temporel des différents acteurs de l'exocytose.

La tomographie électronique, combinée pour la première fois à l'ampérométrie à fibre de carbone, montre que la formation des domaines lipidiques passe par la fasciculation de filaments d'actine, dépendante de l'Annexine A2, reliant le granule à la membrane plasmique (Fig 1B). Ces faisceaux d'actine semblent participer directement au recrutement et à la fusion des granules à la membrane plasmique. La description tridimensionnelle de ces torons d'actine formés par l'Annexine A2 au niveau des sites d'exocytose (Fig 1C) représente une avancée majeure dans la compréhension du mécanisme de la sécrétion neuroendocrine. Ainsi, la fasciculation par l'Annexine A2 de ces filaments d'actine ancrés à la membrane plasmique pourrait promouvoir la coalescence des microdomaines membranaires et/ou limiter leur diffusion latérale. Les résultats suggèrent un modèle (Fig 1D) dans lequel le regroupement des microdomaines lipidiques par l'ancrage d'actine fasciculée à la membrane plasmique constitue une étape de la maturation des sites d'exocytose. Ceci confère à l'Annexine A2 un rôle pivot dans le processus d'assemblage combinant lipides et cytosquelette d'actine pour former des plateformes d'exocytose permettant successivement l'arrimage puis la fusion des granules de sécrétion.

Cette étude est le fruit d'une collaboration entre des chercheurs de l'INCI, les ingénieurs de la Plateforme Imagerie In Vitro, Neuropôle de Strasbourg, et Franck Delavoie du Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote, UMR5099 CNRS-Université de Toulouse III Paul Sabatier.



**Figure** : 1A : Cellules chromaffines contenant des granules de sécrétion à cœur dense ; image de microscopie électronique par transmission. B : Immunomarquage de l'Annexine A2 (billes d'or) sur les filaments d'actine qui ancrent les granules de sécrétion à la membrane plasmique des cellules chromaffines. Image de microscopie électronique par transmission. C : Vue de profil d'un granule ancré à la membrane plasmique obtenue par tomographie électronique. D : Représentation schématique du mode d'action de l'Annexine A2 (AnxA2) au cours de l'exocytose. © S. Chasserot-Golaz. F. Delavoie

## **Annexe 4**



## En direct des labos

Nouvelles publications scientifiques, créations de laboratoires, annonces de prix, brevets... Avec "En direct des labos", retrouvez toutes les deux semaines des informations issues des instituts du CNRS et complémentaires des communiqués de presse.

21.09.2015 Un nouveau rôle pour le cytosquelette d'actine au cours de la sécrétion neuroendocrine



Le trafic membranaire qui assure le fonctionnement des systèmes nerveux et neuroendocrine nécessite des changements d'organisation de la membrane plasmique et du cytosquelette. Des chercheurs de l'Institut des neurosciences cellulaires et intégratives apportent une contribution majeure à la compréhension de ces processus. Ils révèlent que, dans les cellules chromaffines, la protéine Annexine A2 forme des faisceaux de filaments d'actine qui participent à la mise en place de domaines lipidiques spécifiques nécessaires à l'assemblage des sites d'exocytose et à la fusion des granules de sécrétion avec la membrane plasmique. Cette étude est publiée dans la revue *Journal of Cell Biology*.

[Pour en savoir plus](#)

[... Et retrouvez les derniers communiqués de presse du CNRS](#)

# JGP

[about JGP](#) | [meet our editors](#) | [alerts & feeds](#) | [permissions](#) | [contact us](#) | [subscribe](#) | [submit](#)

[HOME](#) | [CURRENT ISSUE](#) | [NEWEST ARTICLES](#) | [RESEARCH](#) | [SYNTHESES](#) | [ARCHIVE](#)



[JGP Home](#) > [2015 Archive](#) > [September](#) > [Gabel et al. 146 \(3\): 1463OIA51](#)



**Of Interest - From the JCB:**

**Annexin A2-dependent actin bundling promotes secretory granule docking to the plasma membrane and exocytosis**

Marion Gabel, Franck Delavoie, Valérie Demais, Cathy Royer, Yannick Bailly, Nicolas Vitale, Marie-France Bader, and Sylvette Chasserot-Golaz

[J Gen Physiol](#) 2015 146:1463OIA51-. Published August 31, 2015, doi:10.1085/jgp.1463OIA51

» [Citation Only](#)

## Formation des sites d'exocytose dans les cellules chromaffines : importance fonctionnelle, régulation et externalisation de l'Annexine A2

### Résumé

L'exocytose est un mécanisme biologique fondamental qui permet la libération du contenu des granules de sécrétion dans le milieu extracellulaire. C'est un processus finement régulé par le calcium qui nécessite entre autre, la réorganisation de la membrane plasmique et la formation de domaines lipidiques. Dans les cellules chromaffines, l'annexine A2, protéine capable de lier les phospholipides et l'actine de manière calcium-dépendante, est responsable de la formation et de la stabilisation de ces plateformes lipidiques. Le résultat majeur de ma thèse concerne l'organisation tridimensionnelle et le rôle de l'actine au niveau des sites d'exocytose. Sachant que la phosphorylation de la tyrosine 23 de l'annexine A2 affecte sa liaison à l'actine et aux membranes, deux acteurs majeurs de l'exocytose, j'ai mis en évidence l'importance fonctionnelle de cette phosphorylation. Une autre conséquence de cette phosphorylation est le passage de l'annexine A2 de la face interne à la face externe de la membrane plasmique. Le mécanisme de sortie et le rôle de l'annexine A2 extracellulaire dans les cellules chromaffines ont également été étudiés.

**Mots clés :** Annexine A2, exocytose, microdomaines lipidiques, actine, phosphorylation, externalisation

### Abstract

Exocytosis is a fundamental biological mechanism which allows liberation of the contents of secretory granules into the extracellular medium. This calcium-regulated process requires the formation of lipid domains for the structural and spatial organisation of exocytotic sites. In the chromaffin cell, annexin A2, a calcium-, actin- and lipid-binding protein participates in the formation and stabilization of lipid microdomains. The major advance resulting from my thesis is the elucidation of the three-dimensional organization and the role of actin at the exocytotic site. Phosphorylation of the tyrosine 23 is known to affect the binding of annexin A2 to actin filaments and plasma membrane, two major actors of the exocytotic process and my results highlight the functional importance of this phosphorylation on exocytosis. Furthermore, tyrosine 23 phosphorylation also triggers a translocation of annexin A2 to the external face of the plasma membrane. The role and functional significance of this externalization was also examined.

**Key words:** Annexin A2, exocytosis, lipid domains, actin, phosphorylation, externalization