

UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT
ÉCOLE DOCTORALE B3MI
BIOCHIMIE, BIOTHÉRAPIES, BIOLOGIE
MOLÉCULAIRE ET INFECTIOLOGIE

T H È S E
pour obtenir le titre de
Docteur en Sciences

Présentée et soutenue par
Ouardane Gurvan JOUANNOT

**Étude de l'exocytose des granules de
sécrétion : arrimage à la membrane
plasmique et expansion du pore de fusion**

Thèse dirigée par François Darchen,
préparée à l'université des Saints-Pères, UMR8192

soutenue le 20 Septembre 2012

Jury :

<i>Président :</i>	Thierry GALLI	INSERM (Paris)
<i>Rapporteurs :</i>	Christophe LAMAZE	INSERM (Paris)
	Nicolas VITALE	INSERM (Strasbourg)
<i>Directeur :</i>	François DARCHEN	INSERM (Paris)
<i>Examineur :</i>	David PERRAIS	CNRS (Bordeaux)

Une vie passée à faire des
erreurs n'est pas seulement plus
honorabile, mais également plus
utile qu'une vie passée à ne rien
faire.

George Bernard Shaw

Résumé : L'exocytose est le processus cellulaire de fusion des membranes d'organites de sécrétion avec la membrane plasmique. La sécrétion se déroule en une suite d'étapes : leur synthèse depuis l'appareil de Golgi, les vésicules de sécrétion sont transportées vers la région subplasmalemmale. Les vésicules s'arriment alors à la membrane plasmique, et sont amorcées à la fusion. Quand la cellule est stimulée, les vésicules fusionnent avec la membrane plasmique, la première étape de la fusion correspond à la formation d'un pore de fusion. Ce pore se dilate ensuite permettant la libération complète du contenu de la vésicule.

Au cours de cette thèse, nous avons étudié la dynamique des granules de sécrétion dans des cellules neuro-endocrines. Différentes étapes de l'exocytose ont été étudiées : l'arrimage des granules de sécrétion à la membrane plasmique et la dilatation du pore de fusion.

Dans la première partie de ma thèse, nous avons étudié le rôle de la protéine Myrip. La protéine Myrip est une protéine adaptatrice, qui forme un complexe avec la protéine Rab27a, présente à la surface des granules de sécrétion, et la Myosine Va, un moteur moléculaire. De plus, Myrip a également un domaine d'interaction avec l'actine. Nous avons montré que l'extinction de l'expression de Myrip provoque une redistribution des granules de la périphérie de la cellule vers la région péri-nucléaire. En utilisant deux approches complémentaires d'imagerie, l'une utilisant la photo-activation, l'autre l'imagerie à onde évanescente et le suivi d'objets individuels, nous avons montré que Myrip jouait un rôle dans l'arrimage des granules à la membrane plasmique. Ces résultats montrent que Myrip augmente la rétention périphérique ainsi que l'arrimage à la membrane plasmique. Le double rôle d'adaptateur pour la Myosine Va et l'interaction propre du domaine C-terminal avec l'actine permet de coupler la rétention périphérique et l'arrimage à la membrane plasmique.

Dans une deuxième partie, nous avons étudié le rôle de Cdc42 dans la dilatation du pore de fusion. Après l'arrimage, les granules de sécrétion sont apprêtés à la fusion. Lors de la stimulation de la cellule, un pore de fusion d'un diamètre de un à dix nanomètres se forme et connecte la lumière de

la vésicule au milieu extracellulaire. Ce pore se dilate ensuite provoquant la libération totale du contenu de la vésicule. Nous avons montré que l'extinction de l'expression de la protéine Cdc42, de la famille des Rho GTPases, réduisait le nombre d'évènements de libération complète et rapide du contenu vésiculaire. Nous avons observé que le transport des vésicules, l'arrimage à la membrane plasmique et la probabilité de fusion n'étaient pas affectés par l'extinction de Cdc42. L'étape concernée est celle de la dilatation du pore de fusion. En effet, des mesures d'ampérométrie à fibre de carbone et d'imagerie à onde évanescente ont montré qu'en l'absence de Cdc42, la cinétique de dilatation du pore de fusion était plus lente. De plus, l'inhibition de Cdc42 provoque une augmentation de la proportion d'évènements abortifs caractérisés par la fermeture du pore de fusion avant la fin de la libération du contenu vésiculaire ou l'absence de dilatation du pore de fusion. Des mesures de forces ont montré une réduction de la tension de la membrane plasmique lors de l'extinction de l'expression de Cdc42. Le phénotype peut être restauré en plongeant les cellules dans un milieu hypoosmotique qui augmente la tension. On peut également mimer les effets de CDC42 avec de la blebbistatine, une drogue inhibitrice de la Myosine II qui diminue également la tension de la membrane. CDC42 joue donc un rôle critique dans l'exocytose et plus généralement, ce travail montre que la régulation de la tension de la membrane plasmique intervient dans la dilatation du pore de fusion.

Dans une troisième partie, nous avons développé le couplage de l'imagerie à onde évanescente et de l'ampérométrie. L'imagerie à onde évanescente permet d'avoir une très bonne résolution spatiale lors de l'observation d'évènements d'exocytose. L'ampérométrie permet une très bonne résolution temporelle. Le couplage des deux techniques permettrait de tirer partie de ces deux techniques. Pour coupler les deux, nous avons utilisé des lamelles recouvertes d'oxyde d'indium et d'étain (ITO, matériau transparent et conducteur) servant d'électrode de mesure, sur lesquelles les cellules ont été cultivées. L'ITO permet également l'imagerie par onde évanescente. Nous sommes parvenus à faire la preuve du principe.

Les techniques d'imagerie (onde évanescente et photo-activation) utilisées au cours de cette thèse ont permis d'aborder divers aspects de l'exocytose,

en particulier la dynamique des dernières étapes menant à la fusion et à la libération du contenu des granules de sécrétion.

Mots clés : Exocytose régulée, cellules BON, cellules chromaffines, imagerie à onde évanescente, analyse d'image, arrimage à la membrane plasmique, cortex d'actine, Myrip, photo-activation, ampérométrie, pore de fusion, Cdc42, tension de la membrane plasmique, piège optique, STED, granules de sécrétion.

Study of secretion granules exocytosis : docking and fusion pore dilation

Abstract : Regulated exocytosis is a cellular process of fusion of the membrane of secretory organelles and the plasma membrane. This process is involved in numerous important phenomenon, as hormones secretion in blood stream, or in the secretion of neurotransmitters at the synapse. Secretion is achieved by the succession of several steps : after their synthesis from Golgi apparatus, secretion vesicles are transported to the plasma membrane. Vesicles then dock and are primed. When the cell is stimulated, fusion is triggered between vesicles and plasma membrane, forming a small fusion pore. This fusion pore is then dilated allowing complete release of the vesicle content.

During this thesis, we have studied dynamics of secretion granules in neuroendocrine cells. Different steps of exocytosis have been studied : docking at the plasma membrane and fusion pore dilation.

In the first part of my thesis, we have studied the role of Myrip. Myrip is an adaptator protein that assembles Rab27a with the Myosin Va, a molecular motor, at the granule surface. Myrip also has a interacting domain with actin. We have shown that silencing of Myrip expression redistribute granules from cell periphery to the peri-nuclear region. Electron microscopy showed an increase in the distance of the granules from plasma membrane. Using a new photo-activation method and total internal reflexion microscopy (TIRFM), we showed that Myrip and his C-terminal domain are involved in docking of secretion granules.

These results show that Myrip increase retention to cell periphery and docking. The double role of Myrip as an adaptator for Myosin Va and interaction with actin of the C-terminus domain allows to couple retention of the granules to the periphery and docking at the plasma membrane.

In the second part of my thesis, we studied the role of Cdc42 in the dilation of the fusion pore. After docking and priming at the plasma membrane, a stimulus can trigger the fusion pore formation. The diameter of the fusion pore is small, from one to ten nanometer. It connects the lumen of the vesicle

to the extracellular medium. This fusion pore dilates allowing the full release of the vesicular content. We showed that silencing of Cdc42 (Rho GTPase) expression decrease the number of full release events. We observed that transport, docking and fusion probability were not affected by Cdc42 silencing. The step affected was fusion pore dilation. Amperometric measurements and TIRFM showed that the kinetics of fusion pore dilation were slowed upon Cdc42 silencing. We showed that Cdc42 silencing decreases membrane tension of stimulated cells. A rescue of the phenotype can be achieved by bathing cells in an hypoosmotic medium which increase membrane tension. We can also mimic Cdc42 silencing effect by using blebbistatin which inhibits Myosin II and also decreases membrane tension.

Cdc42 plays a critical role in exocytosis, and membrane tension may be a important driving force of fusion pore dilation, allowing full realease of vesicular content.

In a third part of my thesis, we have coupled TIRFM and amperometry. TIRFM has a high spatial resolution, and amperometry has a high temporal resolution. Coupling of the two technics allows a very good characterisation of events.

In order to couple TIRFM and amperometry, we used indium-tin oxyde (ITO) coated glass (ITO is a transparent and conductive material) as an electrode for amperometric measurements. ITO allows also observation of the cells using TIRFM. We managed to make a proof of principle of this technique.

Imaging techniques (TIRFM, photo-activation) used in this thesis allowed us to investigate different aspects of exocytosis, especially the dynamics of the last steps leading to fusion and release of granules content.

Keywords : Regulated exocytosis, BON cells, chromaffin cells, TIRFM, image analysis, docking, actin cortex, Myrip, photo-activation, amperometry, fusion pore, Cdc42, plasma membrane tension, optical trap, STED, secretion granule.

Remerciements :

Tout d'abord, je souhaite remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail. *Dr. Thierry Galli* DR2 de l'INSERM à l'institut Jacques Monod a accepté de présider le jury, *Dr. Christophe Lamaze* DR2 de l'INSERM à l'institut Curie (Paris) et *Dr. Nicolas Vitale* DR2 de l'INSERM à l'INCI (Strasbourg) ont généreusement accepté de lire mon manuscrit en un temps record et d'être rapporteurs, et *Dr. David Perrais* CR du CNRS à l'Université de Bordeaux a accepté d'être examinateur de mon jury.

Mes remerciements vont également au *Dr.² François Darchen* pour la direction de ma thèse. Sa patience, son savoir, son intelligence, sa disponibilité m'ont permis de mener ce travail. Merci également d'avoir relu mon manuscrit. Merci de m'avoir aidé lorsque j'étais perdu, scientifiquement et personnellement.

J'aimerais également remercier tous nos collaborateurs, en particulier *Dr. Anne Meunier* et *Dr. Rémy Fulcrand* avec qui j'ai eu le plaisir de partager de longs moments dans la pièce de microscopie, ainsi qu'à leur équipe dirigée par *Dr. Frédéric Lemaître*. Merci également au *Dr. Stéphane Gasman* pour avoir partagé le sujet Cdc42 avec nous, ce qui m'a permis de me plonger dans ce passionnant sujet du pore de fusion.

Mes remerciements vont également à tous les membres de notre laboratoire : merci au *Dr. Claire Desnos* pour sa patience, son expertise et sa disponibilité, merci à *Nathanaël Larochette* pour sa patience, son sens de l'humour, sa bonne humeur, son bon goût, merci au *Dr. Isabelle Fanget* pour son efficacité, sa franchise, sa patience et ses coups de sang (il en faut aussi!), merci à la future *Dr.² Asma Soltani* pour les week-ends au labo, les changements de milieux, et pour avoir été une adorable co-bureau, merci à *Carole Sens* pour ses encouragements, son aide et sa gentillesse, merci au *Dr. Corinne Sagné* et à *Cécile Debacker* pour leurs conseils et leur patience, merci aux *Dr. Bruno Gasnier* et *Dr. Olivier Stettler* pour les échanges scientifiques, merci au *Dr. Seanna O'Regan* pour son humour et sa bonne humeur, ainsi qu'au *Dr. Christine Anne-Longrin*, à *Adrien Jezegou*, *Christopher Ribes* et *Éli Berda*.

Merci également aux membres passés du laboratoire : *Dr. Raquel Ruivo, Dr. Jean-Sebastien Schonn, Viviane Sébille, Dr. Azita Sharifi, Dr. Praveen Belagal, Dr. Xiong Chen, Jean-Charles Graziano*, ainsi qu'à nos stagiaires enthousiastes *Patricia 'lil sis' Meireles, Fabrice 'Poussinet', France, Doriane, Tim, Clément, Julie...*

J'aimerais particulièrement remercier le *Dr. Marine Bretou*. Travailler avec *Marine* a été un réel plaisir. Sa gentillesse, son acharnement au travail, son humilité, sa patience, sa compétence et son expertise en font quelqu'un d'exceptionnel.

J'aimerais également remercier ma famille, mes amis, mon entourage. Merci à *Daniel Florentin* pour son amitié sans faille, quelque soit les distances qui nous séparent. Merci à *Cyril* pour avoir été à mes côtés aux travers de multiples projets et d'épreuves. Merci à mes excellents associés *Michel Caux, Zerty, Théa, Anthony, Drébon, Floflo, Anne, Sasso* et *Minipousse* pour leur courage, leur esprit d'aventure, et leur humour qui sont une inspiration. Merci en particulier à *Anne* et *Floflo* dont la conversation m'a permis d'évacuer certaines angoisses. Merci à *Dr. Ryo*, en particulier pour ses meta-balls, et son aide sur les montages électroniques. Merci à *Florence* pour ces dernières années, pour le coca et les fautes d'orthographe. Merci à *Ian Parizot* pour son amitié et pour m'avoir ouvert un champ d'épanouissement au travers de l'improvisation théâtrale. Merci à *Romain* pour avoir été là, pour la nourriture et les pâtisseries. Merci à *Geoffrey, Élise* et *Lukas* pour la pause. Merci à *Dr. Flore* (merci pour la nomenclature!) et *Ugo*. Merci à ma tante *Claire*. Merci à la grand-mère de *Daniel* pour m'avoir montré que nous faisons partie d'un processus scientifique ancré sur le passé et dirigé vers l'avenir.

Merci à la communauté du logiciel libre qui m'a permis de réaliser cette thèse, entre autre : *ImageJ*, \LaTeX , *emacs*, *auctex*, *gnumeric*, *R*, *blender*, *inkscaoe*, *gimp*, etc.

Merci à l'ENS Cachan pour ma bourse de thèse, et à l'AFH pour le financement de nos projets.

Table des matières

1	Introduction	1
1.1	L'exocytose régulée	1
1.2	Modèles cellulaires	2
1.3	Structure et formation des vésicules de sécrétion	4
1.3.1	Structure et contenu des granules de sécrétion	4
1.3.2	Formation des vésicules par le trans-Golgi	7
1.4	Transport des vésicules de sécrétion de la zone péri-nucléaire vers la membrane plasmique	10
1.4.1	Transport des granules immatures	10
1.4.2	Maturation des granules de sécrétion	11
1.5	Cinétique de l'exocytose et différents groupes de granules	17
1.6	Du cortex d'actine à la membrane plasmique	19
1.6.1	Assemblage du complexe Rab27a / Myrip / Myosine Va autour de la vésicule de sécrétion	19
1.6.2	Rôle du complexe Rab27a / Myrip / Myosine Va dans l'arrimage à la membrane plasmique	21
1.6.3	Attachement à la membrane plasmique	22
1.6.4	Arrimage à la membrane plasmique	25
1.7	Fusion des membranes	33
1.7.1	Amorçage des vésicules de sécrétion à la fusion	34
1.7.2	Déclencheur de la fusion : la Synaptotagmine	46
1.7.3	Formation du pore	50
1.7.4	Mode de fusion : complète ou partielle?	61
1.8	Recyclage des vésicules de sécrétion	67
1.8.1	Recyclage du complexe SNARE	67
1.8.2	Endocytose clathrine-dépendante à la suite d'évène- ments de fusion complète	67
1.8.3	Recyclage des vésicules après fusion partielle	69
1.9	Méthodes d'étude et d'analyse de l'exocytose	70

1.9.1	Sur population : immuno-détection, radiodétection, ELISA	70
1.9.2	Méthodes électriques	72
1.9.3	Imagerie	76
1.10	Conclusion	84
2	Myrip et l'arrimage à la membrane.	87
2.1	Introduction	87
2.1.1	Rab27a	87
2.1.2	Myrip, protéine adaptatrice ?	92
2.1.3	Myosine Va	95
2.1.4	Cortex d'actine	98
2.1.5	Hypothèses et objectifs	98
2.2	Résultats	98
2.2.1	Myrip peut s'associer à Rab27a et à la Myosine Va	99
2.2.2	Myrip joue un rôle dans la distribution des vésicules en les retenant dans la zone subplasmalemmale	101
2.2.3	Myrip retient les vésicules de sécrétion dans le cortex d'actine grâce à son domaine C-terminal	108
2.2.4	Myrip intervient dans la dynamique des granules de la sécrétion, des microtubules jusqu'à l'arrimage à la membrane plasmique	112
2.3	Discussion	126
2.3.1	Myrip recrute la Myosine Va permettant la rétention dans la zone périphérique	126
2.3.2	Modélisation du trafic des granules de sécrétion dans la cellule	127
2.3.3	Myrip arrache les granules des micro-tubules	130
2.3.4	Myrip séquestre les granules dans le cortex d'actine	130
2.3.5	Le paradoxe de Myrip	132
2.3.6	Rôle du domaine C-terminal de Myrip dans l'arrimage des granules de sécrétion	133
2.3.7	Conclusion sur le rôle du complexe Rab27a / Myrip / Myosine Va	134

2.3.8	La photo-activation permet un test rapide de la rétention à la membrane plasmique	135
2.4	Matériel et méthodes	137
2.4.1	Anticorps, réactifs et milieux de culture	137
2.4.2	Constructions	137
2.4.3	Cellules, milieux de culture et transfection	138
2.4.4	Co-immunoprécipitation	139
2.4.5	Immunofluorescence	139
2.4.6	Immuno-microscopie électronique à cryogénéisation à haute pression	140
2.4.7	Imagerie à onde évanescente	141
3	Cdc42 et le pore de fusion	147
3.1	Introduction	147
3.1.1	Rôles du cytosquelette dans l'exocytose régulée	148
3.1.2	Dynamique du cortex d'actine	153
3.1.3	La dynamique du pore de fusion	156
3.1.4	Tension de la membrane plasmique	160
3.1.5	Hypothèses et objectifs	162
3.2	Résultats	162
3.2.1	Cdc42 diminue le nombre d'évènements d'exocytose	163
3.2.2	Cdc42 n'affecte pas le transport, ni l'arrimage des vésicules à la membrane	165
3.2.3	Cdc42 affecte la capacité de libération des vésicules de sécrétion	167
3.2.4	Cdc42 favorise les évènements de libération partielle	171
3.2.5	Cdc42 n'affecte pas la probabilité de fusion	179
3.2.6	Le recrutement de Cdc42 à la membrane plasmique et le remodelage du cortex d'actine	181
3.2.7	La tension de la membrane plasmique est diminuée par l'extinction de l'expression de Cdc42	185
3.2.8	La diminution de la tension de la membrane mime les effets de l'extinction de l'expression de Cdc42	188

3.3	Discussion	190
3.3.1	Cdc42 dilate le pore de fusion	190
3.3.2	Optimisation de la détection d'évènements de libération partielle par imagerie à onde évanescente	191
3.3.3	Recrutement de Cdc42	193
3.3.4	Remodelage de l'actine	194
3.3.5	La tension de la membrane régule l'expansion du pore de fusion	194
3.3.6	Les différents régulateurs du pore de fusion et de la tension de la membrane	196
3.3.7	Régulation de la membrane : localement ou globalement ?	197
3.3.8	Rôles physiologiques de la régulation de tension de la membrane plasmique au cours de l'exocytose	198
3.3.9	Conclusion	200
3.4	Matériel et méthodes	200
3.4.1	Vecteurs et siARN	200
3.4.2	Culture cellulaire	201
3.4.3	Imagerie à onde évanescente	203
3.4.4	Ampérométrie à fibre de carbone	206
3.4.5	Mesure de tension de la membrane plasmique	207
3.4.6	Test de la charge des vésicules	209
4	Preuve de principe	211
4.1	Introduction	211
4.1.1	État des lieux des techniques d'investigation de l'exocytose et du pore de fusion	212
4.1.2	Questions biologiques élucidables grâce au couplage de la microscopie à onde évanescente et de l'ampérométrie	213
4.1.3	Cahier des charges	214
4.2	Choix techniques et enjeux	215
4.2.1	Ingénierie de la chambre	215
4.2.2	Préparation des cellules	219
4.3	Résultats	219

4.4	Discussion et perspectives	221
4.4.1	Limites actuelles de la technique	221
4.4.2	Augmenter la probabilité d'avoir une cellule observable	221
4.4.3	Synchroniser les acquisitions	223
4.5	Matériel et méthodes	223
4.5.1	Culture cellulaire	223
4.5.2	Électroporation de sérotonine	224
4.5.3	Réalisation de la chambre	224
4.5.4	Imagerie à onde évanescente	226
4.5.5	Enregistrement ampérométrique	226
5	Discussion	229
5.1	Rôles du cortex d'actine dans l'exocytose	229
5.2	Les sondes de l'actine	231
5.3	Analyse d'image	232
5.4	La dynamique de l'actine	234
A	Bibliographie	239
B	Articles	303

Table des figures

1.1	Structure des granules de sécrétion	4
1.2	Schéma des étapes de la maturation des granules de sécrétion.	15
1.3	Traversée du cortex d'actine.	17
1.4	Assemblage des molécules à la surface de la vésicules de sécrétion.	20
1.5	Microscopie électronique de vésicules synaptiques.	23
1.6	Différents types de trajectoire.	26
1.7	Rôle de Munc 18 dans l'exocytose.	30
1.8	Les GTPases et l'exocytose.	33
1.9	Complexe SNARE.	35
1.10	Modèles ouvert et fermé de la Syntaxine 1.	38
1.11	Structure de la Synaptotagmine.	48
1.12	Deux modèles d'action de la Synaptotagmine.	50
1.13	Images de microscopie électronique du pore de fusion	52
1.14	Deux modèles pour le pore de fusion : pore protéique, pore lipidique	54
1.15	Modèle de pore de fusion constitué de domaines trans-membranaire de la Syntaxine 1	57
1.16	Différents types d'évènements.	60
1.17	Deux vésicules de sécrétion de taille différente fusionnées à la membrane plasmique (ligne noire). La courbure de la mem- brane est supérieure pour la vésicule la plus grosse (voir les angles en rouge).	61
1.18	Spectres d'excitation de fluorescence de différents mutants de la GFP	64
1.19	Endocytose dépendante des clathrines	69
1.20	L'ampérométrie permet la détection d'évènements d'exocytose individuels.	73
1.21	Réfraction et loi de Snell-Descartes	78
1.22	Microscopie à onde évanescente	80

1.23	Microscopie STED	83
1.24	Schéma bilan de l'exocytose.	85
2.1	Localisation de Rab27a sur les granules de sécrétion	88
2.2	Anatomie de Myrip	92
2.3	Présentation de la Myosine Va.	95
2.4	Myrip recrute la Myosine Va sur les granules de sécrétion. . .	100
2.5	Myrip joue un rôle dans la distribution des granules de sécrétion dans la cellule.	104
2.6	Myrip favorise l'attachement à la membrane des granules de sécrétion.	107
2.7	Méthode de photo-activation par onde évanescente	109
2.8	Myrip retient les granules de sécrétion dans la zone subplasmalemmale.	111
2.9	Myrip affecte la mobilité des granules de sécrétion.	114
2.10	Validation de l'analyse des périodes d'immobilisation comme étude de l'arrimage des granules de sécrétion à la membrane plasmique.	117
2.11	La Myosine Va et Myrip promeuvent l'attachement à la membrane plasmique.	118
2.12	Quantification des effets de l'inhibition de l'expression de MyoVa et de Myrip.	120
2.13	Le domaine C-terminal de Myrip intervient dans l'immobilisation des granules de sécrétion.	122
2.14	Effet de la Myosine Va et de Myrip sur les périodes diffusives.	125
2.15	Modélisation du trafic des granules de sécrétion	128
2.16	Exemple de calcul de coefficient de diffusion instantané.	143
3.1	Image du cytosquelette	148
3.2	Image de microscopie électronique de la zone subplasmalemmale.	152
3.3	Immuno-transfert de Western.	163
3.5	Cdc42 régule l'exocytose.	164
3.6	Cdc42 n'affecte pas le transport et l'arrimage des granules de sécrétion.	166

3.7	L'ampérométrie permet d'étudier l'exocytose.	168
3.8	Cdc42 affecte la capacité de libération des granules de sécrétion.	169
3.9	Cdc42 ne modifie ni la taille des granules ni leur charge de sérotonine	170
3.10	Cdc42 favorise les pieds isolés dans les traces ampérométriques.	172
3.11	Cdc42 favorise les événements de fusion partielle.	177
3.12	Durée des événements de libération partielle et de fusion com- plète.	178
3.13	Cdc42 n'affecte pas la probabilité de fusion.	180
3.14	Cdc42-GFP n'est pas recruté à la membrane plasmique	182
3.15	Cdc42 ne semble pas modifier le remodelage du cytosquelette .	185
3.16	Cdc42 diminue la tension de la membrane plasmique dans les cellules stimulées.	187
3.17	La blebbistatine diminue la tension de la membrane plasmique et provoque des événements de libération partielle.	189
4.1	Principe du couplage de l'imagerie à onde évanescente et de l'ampérométrie	212
4.2	Montage de la chambre expérimentale.	217
4.3	Différents motifs de résines.	218
4.4	Le couplage de l'imagerie à onde évanescente et de l'ampéro- métrie permet la détection synchrone d'événements de fusion .	220
4.5	Amélioration par micro-fluidique du dépôt des cellules	222
4.6	Méthode de fabrication des montages de couplage.	225
5.1	Différentes sondes de l'actine	231
5.2	Effet de Cdc42 sur le cortex d'actine	233
5.3	Dynamique de l'actine par photo-activation	236

Introduction

L'exocytose régulée dans les cellules neuro-endocrines

Cette thèse traite de *l'exocytose régulée* dans *les cellules neuro-endocrines*. En particulier, nous nous sommes intéressés aux aspects *dynamiques* de l'exocytose au travers du suivi de l'organite central : *les granules de sécrétion*. Nous avons utilisé comme modèle les *cellules BON*, et comme méthodes des approches optiques (microscopie, imagerie à onde évanescente, piège optique) et des approches ampérométriques.

1.1 L'exocytose régulée

L'exocytose régulée décrit la libération de molécules actives (hormones, neurotransmetteurs) dans le milieu extra-cellulaire suite à une stimulation. La concentration intracellulaire du calcium augmente, provoquant la fusion d'organites spécialisés (granules de sécrétion, vésicules synaptiques) avec la membrane plasmique.

On retrouve ce mécanisme chez de nombreux types cellulaires : les neurones, les cellules neuro-endocrines, mais aussi chez les astrocytes, les cellules des glandes exocrines, etc.

L'importance du calcium dans l'exocytose régulée a été observée par *Douglas* et *Rubin* en 1961 : la perfusion d'une glande adrénale de chat avec un milieu sans calcium perturbe la libération de catécholamines induite par l'acétylcholine [[Douglas and Rubin, 1961](#)]. Les sources de l'augmentation du calcium sont différentes en fonction de l'intensité de la stimulation. La dé-

polymérisation de la membrane plasmique provoque l'ouverture de canaux à sodium voltage dépendant. Ces canaux permettent alors l'entrée du sodium dans la cellule, réduisant d'autant plus le potentiel membranaire, ce qui mène à l'ouverture de canaux calciques et à l'entrée du calcium. Cependant, le calcium peut également être libéré par les endosomes ou les mitochondries [Cuchillo-Ibanez et al., 2002, Montero et al., 2002].

Dans cette introduction, après avoir présenté les modèles cellulaires utilisés pour l'exocytose régulée, nous détaillerons la structure des vésicules de sécrétion, puis nous verrons les étapes successives de l'exocytose : formation des vésicules, transport vers la membrane plasmique, maturation, arrimage à la membrane plasmique, amorçage de la fusion, fusion avec la membrane plasmique, et enfin le recyclage des vésicules.

1.2 Modèles cellulaires

L'exocytose régulée est étudiée dans de nombreux modèles cellulaires. Les neurones suscitent le plus d'intérêt, car l'exocytose régulée est particulièrement importante dans leur fonction. Cependant, ce sont des modèles très difficiles à étudier car ce sont des cellules primaires fragiles et difficiles à maintenir en culture. De plus, les vésicules synaptiques qui participent à l'exocytose sont très petites ($< 50\text{nm}$), et libèrent de faibles quantités de neurotransmetteurs. D'autres modèles sont donc privilégiés : les grandes synapses des cellules bipolaires de la rétine [Zenisek et al., 2000] ou du calice de Held (impliqué dans le système auditif des mammifères) [Sakaba and Neher, 2001], les vacuoles de levures [Peters et al., 2001], et les cellules endocrines. La levure ne possède pas d'exocytose régulée à proprement parler, mais ce modèle a permis d'identifier certains acteurs dont les orthologues interviennent dans l'exocytose régulée d'autres modèles [Ferro-Novick and Jahn, 1994].

De nombreux modèles de cellules endocrines sont utilisés pour étudier l'exocytose régulée :

- les mastocytes, cellules granuleuses des tissus conjonctifs, sécrétant de la sérotonine, de l'histamine et de l'héparine,
- les cellules β du pancréas, cellules sécrétrices d'insuline impliquées dans

la régulation du glucose sanguin,

- cellules chromaffines, cellules des glandes médullosurrénales et des ganglions du système nerveux sympathique. Sans doute le modèle le plus utilisé,
- cellules entérochromaffines BON, lignée cellulaire issue d'une tumeur humaine de l'intestin, sécrétant de la sérotonine.

Dans cette thèse, nous avons exclusivement utilisé les cellules BON. Cependant, les cellules chromaffines sont le modèle le plus étudié, je présenterai donc ces deux modèles.

Chromaffines Les cellules chromaffines ont été décrites initialement par *Kohn et al.* [[Carmichael, 1983](#), [Kohn, 1900](#), [Kohn, 1902](#), [Kohn, 1903](#)]. Leur nom est dû à la coloration brune qu'elles prennent lorsqu'elles sont mises en présence d'un sel de chrome par l'oxydation des catécholamines qu'elles contiennent [[Henle, 1865](#)]. Ces cellules se trouvent dans la medulla de la glande adrénaline. Elles sont innervées par le nerf splanchnique et sécrètent de la noradrénaline, de la dopamine et d'autres molécules suite à une stimulation de l'adrénaline (voir section [1.3.1](#) page suivante).

Ce sont des cellules quiescentes, rondes, d'environ 20µm de diamètre. Elles permettent l'observation en microscopie à onde évanescente ou en ampérométrie (voir section [1.9](#) page [70](#)). Ce modèle a deux inconvénients majeurs : ce sont des cellules primaires, il faut donc préparer des échantillons régulièrement. Elles sont également post-mitotiques ce qui rend les transfections très difficiles.

Cellules BON. Cette lignée est issue d'une tumeur cancéreuse humaine [[Evers et al., 1991](#), [Parekh et al., 1994](#)]. Ces cellules sécrètent les mêmes protéines que les chromaffines [[Ahnert-Hilger et al., 1993](#), [Ahnert-Hilger et al., 1996](#)]. Elles sont adhérentes, et immortalisées, ce qui permet de les cultiver facilement, et de les transfecter.

1.3 Structure et formation des vésicules de sécrétion

Les granules de sécrétion sont des vésicules de stockage impliquées dans la voie de sécrétion. Celle-ci fait intervenir l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique (RE), le système endosomal et lysosomal, interconnectés par des étapes de transport de vésicules étroitement régulées.

1.3.1 Structure et contenu des granules de sécrétion

Les granules de sécrétion des cellules neuro-endocrines sont des vésicules de type vésicules à coeur dense : les images en microscopie électronique de ces organites montrent en effet un contenu très opaque aux électrons (voir FIGURE 1.3.1). Leur diamètre varie entre 150nm et 350nm. Ils représentent 13,5% du volume cytoplasmique et on en compte 10 000 par cellule chromaffine [Kryvi et al., 1979]. Le pH intra-vésiculaire est acide, sa valeur varie entre 5,5 et 5,7 [Winkler and Westhead, 1980].

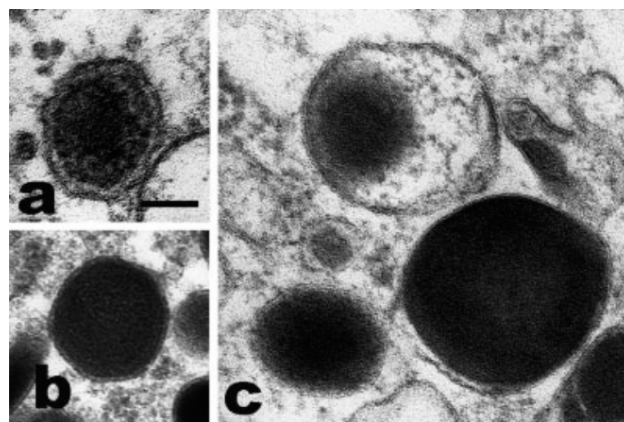


FIGURE 1.1 – Images en microscopie électronique à transmission de cellules chromaffines dans la médullosurrénale. **A)** Image de granule de sécrétion contenant de l'adrénaline. Le contenu est granulaire et d'une densité moyenne. Un léger halo sépare le contenu de la membrane. **B-C)** Granules de sécrétion contenant de la noradrénaline. Les tailles et formes varient. Le contenu est homogène et très dense. Dans certains cas, un halo sépare le contenu de la membrane. L'échelle est la même pour les trois images : 0,2 μ m. Source : [Crivellato et al., 2008].

Les granules de sécrétion contiennent une matrice formée par des protéines de la famille des granines, des catécholamines, des hormones peptidiques, des enzymes et des inhibiteurs de protéase, de l'acide ascorbique, de l'adénosine-tri-phosphate (ATP), et du calcium (voir les revues [Winkler, 1976, Winkler and Westhead, 1980, Winkler, 1982]).

Il y a deux types de granules de sécrétion : ceux qui contiennent de l'adrénaline, et ceux qui contiennent de la noradrénaline. Ces deux types se retrouvent dans des sous-populations différentes de cellules chromaffines [Coupland, 1965]. Ces deux types de vésicules n'ont pas la même morphologie : les vésicules contenant de l'adrénaline présentent une forme ronde avec un contenu granulaire et modérément dense ; celles contenant de la noradrénaline sont irrégulières et ont un contenu homogène très dense (voir FIGURE 1.3.1 page précédente).

Les Granines. Les granules de sécrétion contiennent trois types de granines : la chromogranine A (CGA), la chromogranine B (CGB également appelée sécrétogranine I, SGI), la sécrétogranine II (SGII, également appelée chromogranine C, CGC). Les granines représentent 80% du contenu vésiculaire soluble. Elles jouent le rôle de prohormones (précurseurs d'hormones), mais elles jouent également un rôle très important dans la formation des granules de sécrétion (voir section 1.3.2 page 7). Elles sont proposées pour jouer un rôle dans l'adressage des protéines [Elias et al., 2010].

Neuropeptides. Le contenu en neuropeptides des granules varie d'une espèce à l'autre. De plus, suivant la région de la glande surrénale, les granules

des cellules chromaffines peuvent contenir un assortiment différent de ces neuropeptides [Crivellato et al., 2008]. Parmi ces neuropeptides, on trouve des peptides opioïdes, dont notamment :

- Enképhaline : très présente chez l’homme et chez la vache, elle joue un rôle dans la réponse immunitaire et la réaction inflammatoire.
- Endorphine : cette protéine analgésique est présente sous la forme de β -endorphine, en particulier chez le rat et chez le boeuf, ainsi que dans les cellules PC12 [Goumon et al., 2000].
- Dynorphine : présente en particulier dans les granules contenant de la noradrénaline [Goumon et al., 2000].

Les granules contiennent également le *neuropeptide-Y* (NPY) de la famille des polypeptides pancréatiques. Le NPY est composé de 36 acides aminés. Chez le boeuf, on retrouve 1,9 μ g de NPY dans chaque granule, soit 429 copies [Fischer-Colbrie et al., 1986]. Le NPY stimule la sécrétion de catécholamines des cellules chromaffines [Cavadas et al., 2006].

Les granules contiennent également des Bombésines (impliquées dans la réponse au stress), des facteurs de croissance de transformation beta (Transforming Growth Factor β , TGF- β impliqués dans le développement de nombreux tissus), des Neurotensines (effets analgésiques, déclenchent de l’hypotension, de l’hypertension), des Sécrétoneurines (réponse inflammatoire, angiogénèse), des peptides natriurétiques (effet paracrine/autocrine inhibiteur sur la sécrétion de catécholamines), des Ubiquitines (peptide d’adressage, réponse au stress cellulaire), ainsi que d’autres neuropeptides (EM66, système Rénine-Angiotensine, Adrénomédulline, Calcitonine, Vasostatines, etc.).

Monoamines. Les granules contiennent des Catécholamines ou de la Sérotonine. On retrouve trois types de Catécholamines : l’adrénaline, la Noradrénaline, et la Dopamine. Chez la chèvre, dans les cellules chromaffines, les proportions sont de 51% à 56% d’adrénaline, 42% à 47% de Noradrénaline, et 1.3% à 2% de Dopamine [Yamada et al., 1988]. Chez le boeuf, il y a 79,8% d’adrénaline et 20,2% de Noradrénaline [Van Dyke et al., 1977]. Les granules contiennent également de la Sérotonine [Brownfield et al., 1985, Holzwarth and Brownfield, 1985].

Résumé du contenu et des fonctions des molécules des granules de sécrétion des cellules chromaffines :

Régulation de la pression sanguine	Catécholamines, Nucléotides, Adrénomédulline, Vasostatines, co-enzyme A glutathione disulfide, Neuropeptide-Y, peptide Natriurétique, système rénine-angiotensine
Effets antiseptiques	Enkélitine, Vasostatine I, Chromofungine, Cateslytine, Chromacine, Secretolytine, Ubiquitine, Ubifungine
Régulation de la réaction immunitaire	Enképhaline, VIP, substance P, Bombésine, TGF- β , Sécétoneurine, Nucléotides
Effets analgésiques	Enképhalines, Endorphines, Dynorphines
Fonction paracrine	CGRP, Guanyline, Adrénomédulline, Bombésine, Galanine, Neurotensine

Source : [Crivellato et al., 2008]

1.3.2 Formation des vésicules par le trans-Golgi

Les granules de sécrétion sont formées au niveau du trans-Golgi. Leur formation implique le bourgeonnement de granules à la surface de l'appareil de Golgi, ainsi qu'un recrutement spécifique des molécules de la voie de sécrétion dans ces granules en formation.

Le rôle de la Chromogranine A (CgA) de la famille des Granines semble avoir une importance critique. En effet, l'inhibition de l'expression de la CgA dans les PC12 réduit la formation des granules [Kim et al., 2001]. De plus, la sur-expression de la CgA dans des cellules COS-7 qui ne sont pas des cellules neuro-endocrines, a provoqué la formation d'organites ressemblant à des granules de sécrétion et capables de sécréter des peptides co-transfectés [Montero-Hadjadje et al., 2009]. Cependant, les mécanismes de recrutement des protéines impliquées dans la voie de sécrétion sont plus compliqués, et impliquent différentes Granines.

Deux mécanismes d'adressage des protéines vers les granules de sécrétion

sont proposés :

Mécanisme d'agrégation. Les agrégats de molécules denses qu'on retrouve dans les granules de sécrétion ont également été observés dans le trans-Golgi, sous une forme moins dense et moins grande [Smith and Farquhar, 1966]. Ces résultats ont suggéré l'idée du modèle d'agrégation. *In vitro*, les protéines de la voie de sécrétion régulée s'agrègent en présence de calcium (micro-molaire), et d'un pH acide comme celui de l'intérieur du trans-Golgi. Ceci a été montré en particulier pour les Granines, mais aussi pour de nombreuses autres protéines [Chanat and Huttner, 1991, Colomer et al., 1996, Gerdes et al., 1989, Gorr et al., 1989, Vischer and Wagner, 1994, Shennan et al., 1994, Song and Fricker, 1995, Rindler, 1998]. Ce phénomène est spécifique car les protéines de la voie de sécrétion constitutive ne co-précipitent pas avec celles de la voie de sécrétion régulée [Chanat and Huttner, 1991, Colomer et al., 1996]; de plus, l'adressage des protéines est perturbé si on neutralise le pH du trans-Golgi [Chanat and Huttner, 1991, Gerdes et al., 1989, Moore et al., 1983, Tooze, 1998]. Certaines Granines pourraient jouer le rôle de chaperon et faciliter la précipitation de protéines en concentration trop faible pour précipiter par elles-mêmes [Natori and Huttner, 1996]. Cette agrégation est promue par des prohormones convertases qui modifient par protéolyse les autres protéines de la voie de sécrétion régulée pour aider leur précipitation [Seidah et al., 2008]. L'agrégation des protéines joue donc un rôle important dans l'adressage des protéines vers la voie de sécrétion régulée.

Motifs d'adressage. Ces agrégats interagissent ensuite avec des domaines spécifiques de la membrane du trans-Golgi. Trois motifs protéiques ont été identifiés comme jouant un rôle dans l'adressage :

- Une boucle contrainte par un pont di-sulfure, présente dans l'extrémité N-terminale de la Chromogranine B (ChgB) [Chanat et al., 1993, Glombik et al., 1999, Krömer et al., 1998]. Cette boucle est nécessaire et suffisante à l'adressage des protéines de la voie de sécrétion régulée vers les granules de sécrétion, et permet la liaison du cargo à la membrane

du trans-Golgi [Glombik et al., 1999].

- Une paire d’acides aminés basiques [Dikeakos and Reudelhuber, 2007], trouvés dans la Proneurotensine [Felicangeli et al., 2001], dans la Prorenine [Brechler et al., 1996], et dans la Progastrine [Bundgaard et al., 2004]. La mutation de ce site provoque des erreurs d’adressage des protéines [Dikeakos et al., 2007].
- Une hélice α courte, présente dans la Carboxypeptidase E (CPE) [Dikeakos et al., 2007], PC1/3 et PC2 [Dikeakos et al., 2007], dans la Prosomatostatine [Mouchantaf et al., 2001], dans la Chromogranine A [Taupenot et al., 2002], et dans le précurseur de peptide endocrine VGF [Garcia et al., 2005]. Dans la plupart des cas, ce motif adresse les protéines aux granules de sécrétion [Dikeakos et al., 2007]. La CPE, PC1/3 et PC2 interagissent avec la membrane du trans-Golgi par ce domaine [Assadi et al., 2004, Dhanvantari et al., 2002, Lou et al., 2007]. Certaines protéines sont adressées aux granules de sécrétion par l’interaction avec ces trois protéines associées à la membrane [Cool and Loh, 1998].

Les domaines membranaires auxquels s’associent les motifs d’adressage sont des domaines enrichis en cholestérol [Tsuchiya et al., 2010].

Les protéines de la voie de sécrétion régulée sont donc recrutées par une combinaison d’agrégation des granines principalement et de motifs d’adressage de certaines protéines (granines, CPE) qui interagissent avec des régions enrichies en cholestérol de la membrane du trans-Golgi. Le trans-Golgi bourgeonne alors pour donner naissance à des granules de sécrétion immatures. En effet, de nombreuses prohormones doivent encore être clivées en hormones alors que le pH de la vésicule diminue, activant des prohormones convertases. Ce processus intervient de concert avec le transport vers la membrane plasmique.

1.4 Transport des vésicules de sécrétion de la zone péri-nucléaire vers la membrane plasmique

1.4.1 Transport des granules immatures

La maturation est un processus rapide, si l'on compare sa durée à la durée de vie des granules de sécrétion. Le temps de demi-vie des granules de sécrétion immatures est de $t_{\frac{1}{2}} = 45\text{min}$, alors que le temps de demi-vie des granules de sécrétion matures est de plusieurs jours [Tooze et al., 1991].

En l'espace de quelques secondes, les granules de sécrétion immatures sont acheminés le long des microtubules jusqu'au cortex d'actine filamenteuse (F-actine) [Rudolf et al., 2001]. Bien que ce mouvement soit unidirectionnel, la Dynéine n'intervient pas [Rudolf et al., 2001]. Des études montrent l'implication de Kinésines dans divers types cellulaires : la Kinésine-1 [Varadi et al., 2003], la Kinésine-2 et la Kinésine-3 [Park et al., 2008]. Arrivés à proximité de la membrane plasmique, les granules de sécrétion sont séquestrés dans le cortex d'actine (pour plus de détails sur le cortex d'actine, sa dynamique et son implication dans l'exocytose, voir section 3.1.1 page 147). Ils vont alors s'y déplacer le long du cortex d'actine, effectuer leur maturation et, suite à un stimulus, fusionner avec la membrane plasmique [Desnos et al., 2007b, Rosé et al., 2003, Rudolf et al., 2001, Varadi et al., 2005].

La Myosine Va est un moteur moléculaire processif [Tyska and Mooseker, 2003] qui hydrolyse l'adénosine tri-phosphate (ATP) pour effectuer des pas de 36nm sur des filaments d'actine [Trybus, 2008]. Ce moteur moléculaire est associé aux granules de sécrétion [Rosé et al., 2003, Rudolf et al., 2003, Varadi et al., 2005, Ivarsson et al., 2005]. Il a été montré que la séquestration des granules de sécrétion dans le cortex d'actine et leur déplacement le long de celui-ci dépendaient de la Myosine Va dans les cellules PC12 [Rudolf et al., 2003]. La Myosine Va pourrait également avoir un rôle dans l'attachement au cortex d'actine au-delà de son rôle de moteur, car *in vitro*, la dépendance à l'ATP de son affinité pour l'actine décroît avec le temps [Kögel and

[Gerdes, 2010]. La Myosine Va joue également un rôle dans le remodelage de la membrane des granules au cours de leur maturation (voir section 1.4.2). L'implication de la Myosine Va dans la rétention en périphérie des vésicules et dans leur maturation suggère un couplage entre les deux phénomènes qui n'a pas été démontré.

Une fois arrivées dans le cortex d'actine, les granules de sécrétion vont effectuer leur maturation, impliquant une série d'étapes : la fusion homotypique, le tri par rétention, et l'acidification.

1.4.2 Maturation des granules de sécrétion

Les granules de sécrétion immatures fusionnent les uns avec les autres (voir FIGURE 1.4.2 page 15). Une reconstitution *in vitro* de ce processus réalisée à partir d'extraits de cellules PC12 a permis de montrer que cette fusion homotypique nécessite l'hydrolyse d'ATP et de guanine tri-phosphate (GTP). Elle est également sélective car les granules de sécrétion matures ne peuvent fusionner avec les immatures. Un certain nombre de protéines ont été identifiées comme intervenant dans cette fusion homotypique :

- N-ethylmaléimide sensitive factor (NSF) [Urbé et al., 1998], qui intervient dans la séparation du complexe formé par les protéines SNAREs (SNAP REceptor ; SNAP : Soluble NSF Attachment Protein).
- α -SNAP [Urbé et al., 1998]
- Syntaxine 6 [Wendler et al., 2001], protéine SNARE impliquée dans la fusion des membranes. Les SNAREs de la fusion avec la membrane plasmique lors de l'exocytose régulée (voir section 1.7.1 page 34) ne sont pas impliquées dans cette fusion homotypique. La Syntaxine 6 est nécessaire dans la membrane donneuse et dans la membrane acceptrice, afin de déclencher la fusion homotypique [Wendler et al., 2001, Ahras et al., 2006].
- Synaptotagmine IV [Ahras et al., 2006], interagit avec les granules immatures mais pas les matures, et s'associe à la Syntaxine 6.

Les protéines nécessaires à la fusion entre granules de sécrétion immatures sont différentes de celles nécessaires à la fusion des granules matures avec la

membrane plasmique.

Au cours de la maturation, les granules de sécrétion immatures voient également leur contenu et leur membrane modifiés. Les protéines n'étant pas destinées à faire partie du contenu des granules de sécrétion ainsi que la membrane excédentaire sont éliminées par la formation de vésicules dérivées des granules de sécrétion. Celles-ci se forment grâce à une enveloppe de clathrines. Ce processus s'appelle l'adressage par rétention. Les vésicules dérivées des granules de sécrétion fusionnent avec la membrane plasmique indépendamment de la stimulation, et libèrent leur contenu. Ce processus est proche de celui de l'exocytose constitutive [Arvan and Castle, 1998]. Les protéines de la machinerie de la fusion homotypique sont éliminées par cette voie, en particulier la Syntaxine 6 [Klumperman et al., 1998, Wendler et al., 2001], la Synaptotagmine IV [Ahras et al., 2006, Eaton et al., 2000], et la VAMP 4 [Eaton et al., 2000]. Il apparaît que l'élimination de la Synaptotagmine IV des granules de sécrétion immatures les rend aptes à la fusion suite à une stimulation [Eaton et al., 2000]. D'autres protéines, présentes dans le trans-Golgi, ainsi que dans les granules de sécrétion immatures, sont éliminées par ce processus : l'endoprotéase carboxypeptidase D [Ahras et al., 2006, Dittie et al., 1996, Dittie et al., 1997, Kakhlon et al., 2006, Klumperman et al., 1998, Varlamov et al., 1999, Wendler et al., 2001], la Furine [Dittie et al., 1997], et M6PR (récepteur d'adressage vers le lysosome) [Klumperman et al., 1998]. Enfin, les protéines mal agrégées pourraient être éliminées par cette voie également puisqu'on observe leur exocytose constitutive au cours de la maturation des granules [Glombik and Gerdes, 2000, Molinete et al., 2000]. Il a été proposé que ces protéines éliminées soient organisées en sous-structures prêtes à être éliminées [Katsumata et al., 2007]. En effet, la VAMP 4 et la Syntaxine 6 sont associées dans un même micro-domaine de lipides, mais séparées de la VAMP 2 qui est destinée aux granules de sécrétion matures [Katsumata et al., 2007] (voir FIGURE 1.4.2 page 15).

La formation de ces vésicules dérivées des granules de sécrétion immatures se ferait par assemblage des clathrines à la surface des granules. Ces clathrines sont recrutées par le complexe 1 de protéine adaptatrice des clathrines (AP-1) qui interagit avec la queue cytoplasmique de M6PR, de la

Furine, et de VAMP 4 [Dittié et al., 1997, Dittié et al., 1999, Hinners et al., 2003]. Cette association fait intervenir de nombreuses autres protéines (pour plus de détails, voir la revue [Varadi et al., 2003]).

Le bourgeonnement de ces vésicules dérivées des granules immatures intervient tôt dans le processus de maturation. Dans les cellules PC12, l'élimination de la Furine intervient 12min à 30min après leur formation au niveau du trans-Golgi [Rudolf et al., 2001]. Cette élimination est observée dans le cortex d'actine, et si on sur-exprime un dominant négatif de la Myosine Va ou si on inhibe son expression avec un petit ARN interférant (pARNi), cette élimination disparaît [Kögel and Gerdes, 2010], suggérant l'action d'une force du complexe d'acto-myosine permettant le bourgeonnement des vésicules dérivées. D'autres données montrent que c'est un phénomène rapide : dans les cellules de l'hypophyse antérieure (AtT20), l'élimination de la VAMP 4 intervient \sim 45min après la formation au trans-Golgi [Eaton et al., 2000]. Dans les cellules PC12, les granules de sécrétion immatures acquièrent la capacité à fusionner en réponse à un stimulus 30min après leur formation [Tooze et al., 1991].

La conversion de prohormones en hormones actives au sein de granules de sécrétion immatures est activée par l'acidification du contenu intra-granulaire. Le pH du trans-Golgi est de 6,5-6,2, celui des granules de sécrétion immatures de 6,3-5,7 et celui des granules de sécrétion matures de 5,5-5,0 [Urbé et al., 1997]. Ce processus d'acidification progressif est effectué par l'AT-Pase vésiculaire (v-ATPase), qui transporte des protons dans la lumière des granules. La membrane du granule étant imperméable aux protons, le pH intra-luminal diminue [Jefferies et al., 2008]. Dans les cellules PC12, l'acidification est complète en 90min [Urbé et al., 1997]. C'est ce gradient de protons qui fournit l'énergie nécessaire à l'accumulation des mono-amines [Johnson, 1988]. L'acidification des granules de sécrétion immatures active également les prohormones convertases qui clivent les prohormones pour en faire des peptides actifs biologiquement [Seidah et al., 1993, Steiner, 1998]. L'acidification est un processus indépendant du bourgeonnement des vésicules dérivées des granules de sécrétion immatures. En effet, si on bloque à l'aide d'une drogue le recrutement de AP-1 sur les granules de sécrétion immatures, ou

si on sur-exprime un dominant négatif de la Myosine Va qui interfère avec l'élimination de la Furine [Kögel and Gerdes, 2010], la maturation de la Sécrétogranine II (Sg-II) ou de de la Proopiomelanocortine (POMC) qui dépend de l'acidification des granules immatures n'est pas affectée [Fernandez et al., 1997, Kögel and Gerdes, 2010]. AP-1 et la Myosine Va semblent donc indispensables à l'élimination de certaines protéines, et à la formation des vésicules dérivées des granules immatures, mais pas à l'acidification des granules de sécrétion immatures. À l'inverse, l'inhibition de l'adaptateur de clathrines GGA3 empêche l'élimination de M6PR, de la Syntaxine 6, et de la VAMP 4, et diminue l'activité de PC2, suggérant une interférence dans l'acidification des granules de sécrétion immatures. Le bourgeonnement dépendant de AP-1 et de la Myosine Va ne semble pas indispensable à l'acidification, alors que celui dépendant de GGA3 semble nécessaire. Ceci montre à quel point la maturation des granules de sécrétion est un phénomène complexe, étroitement régulé et loin d'être totalement décrit.

L'acidification permet la transformation des protéines des granules de sécrétion. La Dopamine est transportée grâce au gradient de protons [Johnson, 1988], où elle est transformée en Noradrénaline par la Dopamine- β -hydroxylase (D β H). La Noradrénaline peut alors soit rester dans le granule de sécrétion ou être transportée dans le cytoplasme où elle sera transformée en Adrénaline par la Phényléthanolamine-N-méthyltransférase (PNMT) qui peut être transportée dans les granules de sécrétion. Le transport des mono-amines est assuré par les transporteurs vésiculaires de mono-amines (VMAT1, VMAT2). VMAT est un antiporteur qui échange 2 protons pour un mono-amine. VMAT est donc couplé à la v-ATPase qui établit ce gradient [Johnson, 1988, Henry et al., 1994].

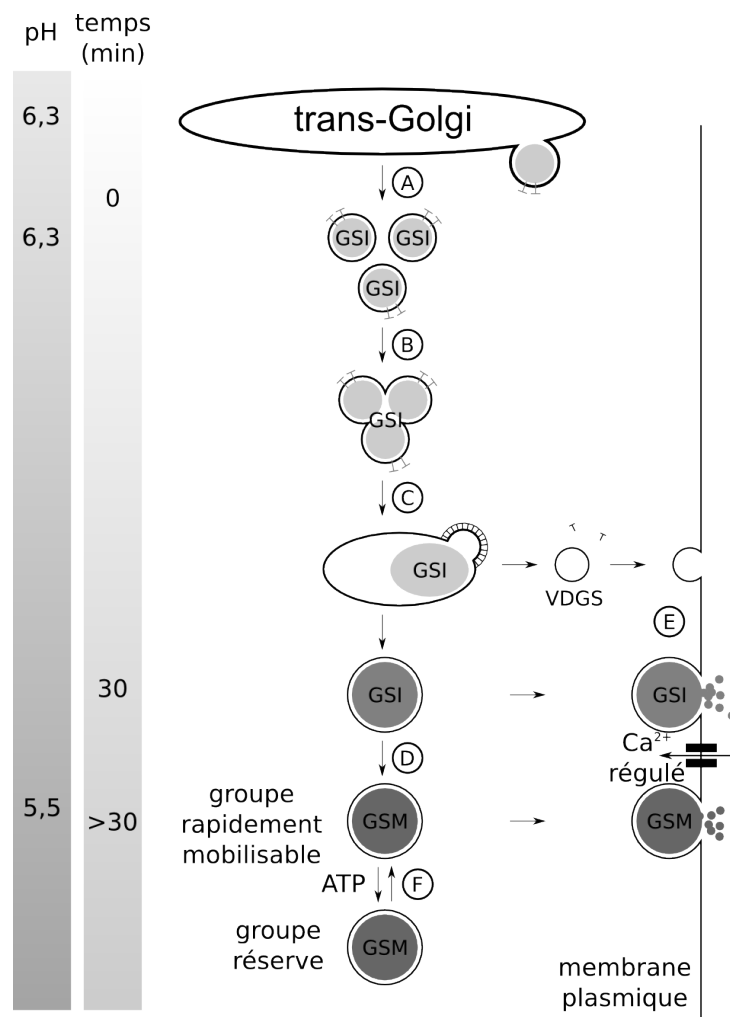


FIGURE 1.2 – **A)** dans le trans-Golgi, les protéines de la voie de sécrétion sont adressées à des granules de sécrétion immatures (GSI) naissantes. **B)** Fusion homotypique des granules de sécrétion immatures. **C)** Les protéines n'étant pas destinées aux granules de sécrétion matures (GSM) ainsi que la membrane en excès sont éliminées par la formation de vésicules dérivées des granules de sécrétion (VDGS) enveloppées de clathrines. Ces vésicules dérivées des granules de sécrétion vont fusionner avec la membrane plasmique indépendamment de tout stimulus. **D)** Les granules de sécrétion immatures vont être convertis en granules de sécrétion matures par acidification, densification du contenu de la lumière du granule, et formation des hormones à partir des prohormones. **E)** Les granules de sécrétion immatures après bourgeonnement de leur vésicules dérivées et une petite fraction des granules matures appartenant au groupe rapidement libérable peuvent fusionner avec la membrane plasmique suite à un stimulus. **F)** La plupart des granules de sécrétion matures sont stockés dans un groupe de réserve. Le passage d'un groupe à l'autre est réversible. *Source (inspiration) : [Kögel and Gerdes, 2010]*

Ces étapes constituent la maturation au sens strict du terme. Cependant, bien que les granules de sécrétion soient complètement équipés pour fusionner, il leur est tout de même nécessaire de passer par une série d'étapes pour être complètement prêts à la fusion. En effet, les granules doivent encore atteindre la membrane plasmique en traversant le cortex d'actine, puis s'attacher à la membrane, s'y arrimer, et enfin amorcer la fusion (voir FIGURE 1.4.2 page ci-contre). C'est seulement une fois ces étapes franchies qu'une entrée de calcium provoquera leur fusion avec la membrane [Sørensen, 2004]. Seule une faible proportion des granules de sécrétion matures vont jusqu'au bout de ce processus (environ 1%) [Sørensen, 2004, Werner and Grose, 2003]. Ils sont alors considérés comme faisant partie du groupe rapidement libérable, alors que le reste des granules matures est considéré comme le groupe de réserve (voir FIGURE 1.4.2 page précédente).

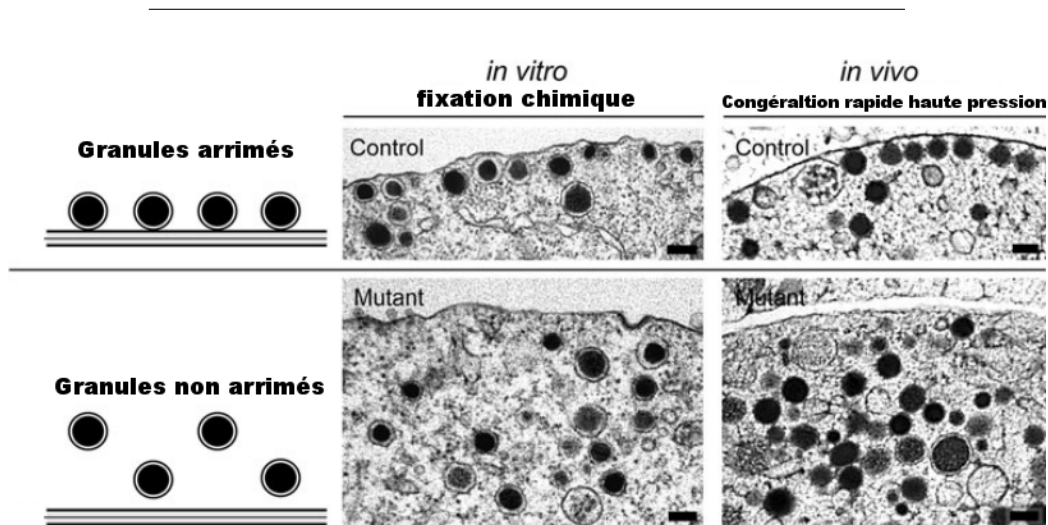


FIGURE 1.3 – Illustration de la traversée du cortex d'actine et de l'arrimage à la membrane plasmique dans des cellules chromaffines. La partie haute représente les granules arrimés à la membrane plasmique, *in vitro* (cellules chromaffines cultivées) et *in vivo* (glande surrénale de souris). La partie basse représente les granules non arrimés. Ce phénotype mutant caractérisé par une diminution de l'arrimage des granules de sécrétion est présent chez les chromaffines qui n'expriment pas la Syntaxine 1. (Source : [de Wit, 2010])

1.5 Cinétique de l'exocytose et différents groupes de granules

L'étude de la cinétique de l'exocytose a révélé que tous les granules de sécrétion ne fusionnaient pas avec la même cinétique lors de la stimulation. Dans les cellules chromaffines, *Augustine* et *Neher* ont mis en évidence l'existence de deux groupes : un petit nombre de granules rapidement libérables est situé à proximité de la membrane plasmique et un groupe de réserve plus important dont l'exocytose est plus lente [Augustine and Neher, 1992]. La photolyse de calcium cagé couplée à la mesure de la capacité de la membrane plasmique (voir section 1.9 page 70) a ensuite permis de mettre en évidence des sous-populations dans ces groupes [Voets et al., 1999, Voets, 2000]. Les

granules peuvent être divisés en quatre groupes distincts [Becherer and Rettig, 2006, Sørensen, 2004].

La photolyse de calcium cagé permet une augmentation quasi instantanée ($\sim \mu\text{s}$) de la concentration intracellulaire du calcium et déclenche l'exocytose. Cette réponse peut être mesurée grâce à la capacité de la membrane plasmique. Les courbes obtenues révèlent plusieurs composantes cinétiques. Une première composante rapide suivie d'une composante lente qui peut être maintenue longtemps. La composante rapide peut être ajustée par une double exponentielle indiquant l'existence de deux groupes de vésicules : les granules rapidement libérables, et les granules libérables lentement.

Le groupe rapidement libérable est composé des granules qui fusionnent entre 20ms et 40ms après l'augmentation du calcium. Ces granules sont considérés comme arrimés à la membrane plasmique et amorcés (voir section 1.6.4 page 25 et section 1.7.1 page 34).

Le groupe libérable lentement est constitué de granules probablement arrimés à la membrane également mais qui fusionnent avec une constante de temps de l'ordre de 200ms.

Ces deux groupes sont en équilibre. En effet, le remplissage du groupe rapidement libérable suite à sa déplétion provoque la diminution du groupe libérable lentement [Voets et al., 1999]. La mesure de la capacité de la membrane plasmique de ces deux groupes permet d'estimer leurs tailles à 150 granules [Moser and Neher, 1997].

Les deux groupes rapidement et lentement libérables sont en équilibre avec le groupe des granules non amorcés. Ces granules ne sont pas prêts à fusionner au moment de la stimulation. Lors de la stimulation, ces granules sont amorcés (voir section 1.7.1 page 34) puis fusionnent avec la membrane plasmique. Ce processus assure la composante lente de l'exocytose qui peut être maintenue dans le temps. Dans le cas des cellules chromaffines, ce groupe est constitué d'environ 750 granules situés à moins de 200nm de la membrane plasmique [Ashery et al., 2000].

Le reste des granules de sécrétion représente le groupe de dépôt (plus de 2000 granules dans une cellule chromaffine de souris adulte [Sørensen, 2004]), situés à plus de 200nm de la membrane plasmique.

1.6 Du cortex d'actine à la membrane plasmique

Après maturation, les vésicules se trouvent dans le cortex d'actine. Ce cortex d'actine est constitué de filaments d'actines, et recouvre l'intérieur de la membrane plasmique sur une épaisseur de 200–400nm. Pour plus de détails sur sa structure et sa dynamique, voir la section 3.1.1 page 147. Le cortex d'actine joue un rôle important dans la mobilité des granules de sécrétion car l'imagerie à onde évanescente dans les cellules chromaffines a montré une réduction de la mobilité des granules de sécrétion dans le cortex d'actine [Johns et al., 2001, Oheim and Stühmer, 2000]. Les drogues qui dépolymérisent l'actine augmentent leur mobilité [Desnos et al., 2003, Johns et al., 2001], alors que les drogues qui stabilisent l'actine diminuent leur mobilité [Lang et al., 2000, Oheim and Stühmer, 2000]. Cette mobilité dépend de l'association aux filaments d'actine par le complexe Rab27 / Myrip (Myosin and Rab interacting protein) / Myosine Va [Desnos et al., 2007a] (pour plus de détails, voir section 2.1 page 87). L'attachement et l'arrimage à la membrane plasmique fait intervenir quant à lui les protéines SNAREs et le complexe Exocyste.

1.6.1 Assemblage du complexe Rab27a / Myrip / Myosine Va autour de la vésicule de sécrétion

Dans les mélanocytes, Rab27a, une petite GTPase associée à la membrane des mélanosomes recrute la Myosine Va par l'intermédiaire de la mélanophiline/Slac2a. Dans les chromaffines et les cellules à insuline, la protéine Rab27a est associée à la membrane des vésicules de sécrétion et recrute la protéine Myrip (également appelée Slac2c, similaire à la mélanophiline) [Fukuda and Kuroda, 2002, Desnos et al., 2003, Waselle et al., 2003]. Myrip interagit avec Rab27a, mais peut également recruter la Myosine Va et la Myosine VIIa [El-Amraoui et al., 2002, Fukuda and Kuroda, 2002, Desnos et al., 2003, Waselle et al., 2003], et possède un domaine d'interaction avec l'actine [Fukuda and Kuroda, 2002, Desnos et al., 2003]. On trouve la Myosine Va associée aux granules de sécrétion [Rosé et al., 2003, Rudolf et al., 2003, Varadi et al.,

2003, Ivarsson et al., 2005, Desnos et al., 2007b]. Cependant, la Myosine Va est également présente dans d'autres régions de la cellule suggérant de multiples rôles. Ces données suggèrent que la Myosine Va est recrutée sur les granules de sécrétion par l'intermédiaire de Myrip et de Rab27a.

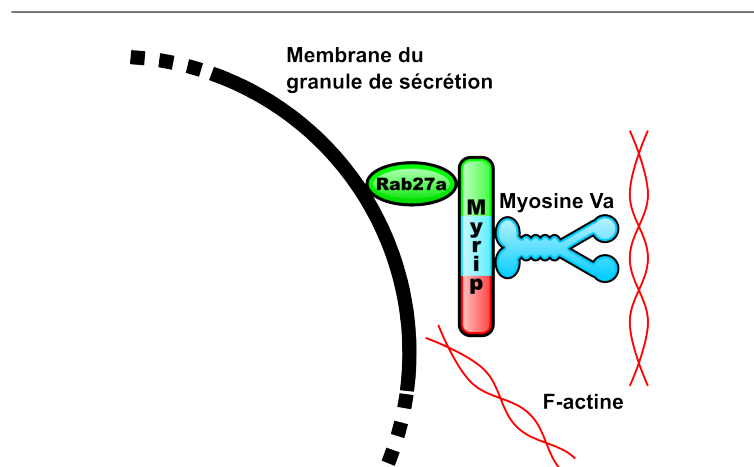


FIGURE 1.4 – Complexe Rab27a / Myrip / Myosine Va à la surface d'un granule de sécrétion. Rab27a est une protéine membranaire des granules de sécrétion qui recrute Myrip, protéine adaptatrice qui possède 3 domaines : un domaine d'interaction avec Rab27a (vert), un domaine d'interaction avec la Myosine Va ou VIIa (bleu), et un domaine d'interaction avec l'actine (rouge). La Myosine Va est un moteur moléculaire processif possédant deux têtes globulaires qui interagissent avec l'actine.

1.6.2 Rôle du complexe Rab27a / Myrip / Myosine Va dans l'arrimage à la membrane plasmique

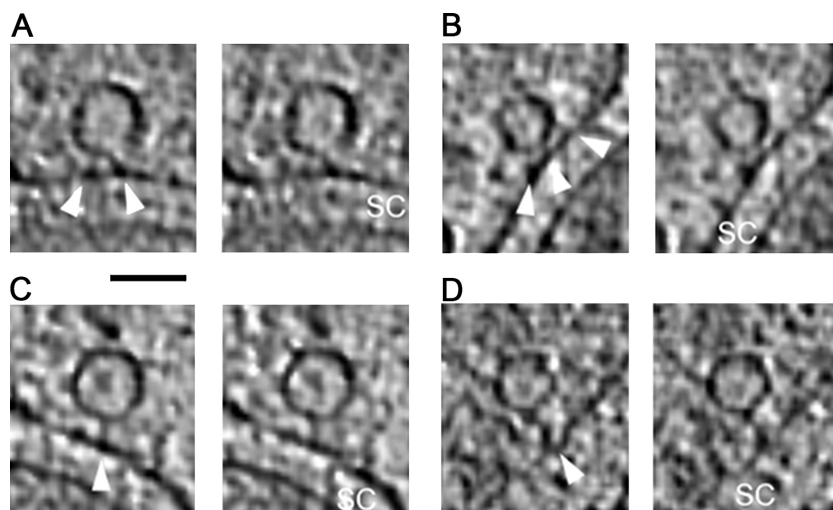
Dans les cellules chromaffines [Rosé et al., 2003] et dans les cellules pancréatiques beta [Varadi et al., 2005, Ivarsson et al., 2005], l'inhibition de la Myosine Va réduit l'exocytose. L'inhibition de l'expression de Rab27a ou de Myrip donnent les mêmes effets [Waselle et al., 2003, Ivarsson et al., 2005]. Étant donné que la Myosine Va est un moteur moléculaire processif, cela suggère que la Myosine Va joue un rôle actif dans le rapprochement des vésicules de la membrane plasmique. La sur-expression d'un dominant négatif de la Myosine Va (MyoVa-tail : ce mutant ne possède pas les têtes globulaires qui se lient à l'actine et permettent le mouvement) provoque l'agrégation des granules de sécrétion dans les cellules PC12 [Rudolf et al., 2003] ou dans les cellules à insuline [Varadi et al., 2005]. Ces données suggèrent que la Myosine Va assure la répartition homogène des granules de sécrétion dans le cortex d'actine. Cependant la MyoVa-tail s'associe aux granules de sécrétion via sa queue dépourvue de tête globulaire, et peut former des dimères. L'agrégation des granules de sécrétion observée en présence de MyoVa-tail pourrait donc refléter la dimérisation de cette protéine plutôt que la perte de la fonction de la Myosine Va. Toutefois, la diminution de l'activité de la Myosine Va diminue la densité des granules de sécrétion observées en imagerie à onde évanescente, et redistribue les granules vers le centre de la cellule [Varadi et al., 2005, Desnos et al., 2007b] suggérant que la Myosine Va joue effectivement un rôle dans la rétention et la distribution des granules dans le cortex d'actine.

L'imagerie à onde évanescente permet également d'observer les granules dans la région subplasmalemmale, de suivre leurs trajectoires individuelles et de les caractériser (mouvement dirigé, mouvement diffusif, immobilisation) [Lang et al., 2000, Oheim and Stühmer, 2000, Huet et al., 2006]. L'inhibition de l'expression de la Myosine Va diminue la probabilité des granules à effectuer de longues périodes d'immobilisation (>15s) [Desnos et al., 2007b]. Ces données suggèrent que la Myosine Va joue un rôle actif dans l'arrimage des granules de sécrétion à la membrane plasmique. De plus, il a été montré qu'il

y a une interaction entre la Myosine Va et la Syntaxine 1 (protéine SNARE impliquée dans la fusion des granules et de la membrane plasmique) [Watanabe et al., 2005]. La Syntaxine 1 et son partenaire Munc 18 sont impliqués dans l'arrimage à la membrane plasmique des vésicules (voir section 1.6.4 page 25). La Myosine Va semble donc responsable de la mobilité des granules dans le cortex d'actine et du transport des granules vers la membrane plasmique, et vers les sites d'arrimage. Une fois le cortex d'actine traversé, les granules vont s'attacher à la membrane plasmique, s'y arrimer, et enfin amorcer la fusion, ce qui terminera le processus leur permettant de fusionner rapidement lors d'un stimulus.

1.6.3 Attachement à la membrane plasmique

La notion d'attachement est assez mal définie. De données expérimentales suggèrent qu'il existe une interaction faible, réversible et de courte durée entre les granules de sécrétion et la membrane plasmique. L'arrimage représente l'étape suivante où les vésicules sont collées et en interaction forte avec la membrane plasmique (voir FIGURE 1.4.2 page 17).



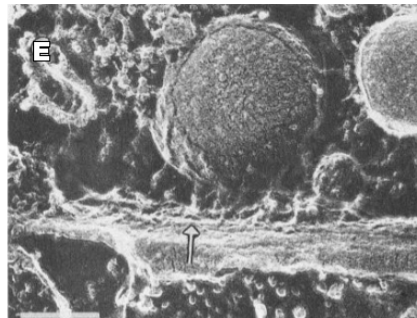


FIGURE 1.5 – **A-D**) Attachements **A-B**) courts ($<5\text{nm}$) **C-D**) longs ($>5\text{nm}$). SC (Synaptic Cleft) : fente synaptique. Deux tranches consécutives ($2,7\text{nm}$ d'épaisseur) sont montrées. Échelle 50nm . (Source : [Fernández-Busnadiego et al., 2010]). **E**) Image de microscopie électronique de granules de sécrétion des cellules chromaffines non stimulées. La flèche indique l'interaction entre un granule et la membrane plasmique. (Source : [Nakata, 1992]).

Les données expérimentales suggérant l'existence de l'attachement des granules de sécrétion à la membrane plasmique sont les suivantes :

- La présence de structures reliant les granules de sécrétion et la membrane plasmique apparaissant dans les images de microscopie électronique des vésicules de sécrétion [Fernández-Busnadiego et al., 2010, Harlow et al., 2001, Rizzoli and Betz, 2004], ainsi que dans les cellules chromaffines [Nakata, 1992] (voir FIGURE 1.6.3 page ci-contre).
- La caractérisation en imagerie à onde évanescente d'un type de mouvement plus contraint que la diffusion mais plus mobile que l'immobilisation [Huet et al., 2006].
- L'existence de périodes d'immobilisation de courte durée ($<10\text{s}$) des granules de sécrétion à la membrane plasmique qui peuvent être considéré soit comme une attachement, soit comme un arrimage court [Desnos et al., 2007b].
- L'existence de périodes d'auto-corrélation négative du mouvement axial en z des granules de sécrétion observés par imagerie à onde évanescente, révélant une forte probabilité pour les granules de changer de direction, et donc de rester à proximité de la membrane plasmique [Allersma et al., 2006, Desnos et al., 2007b].
- L'existence d'un pas de 20nm précédent la fusion des granules de sé-

création dans les cellules BON [Karatekin et al., 2008].

- Dans les neurones d’hippocampe n’exprimant pas Munc 13, le nombre de vésicules arrimés à la membrane est diminué, mais on peut observer une structure filamenteuse qui relie les vésicules à la membrane plasmique [Siksou et al., 2009].

La difficulté d’étudier l’« attachement » (*tethering* en anglais) vient du fait qu’il est difficile de faire la différence entre un attachement à la membrane et la restriction des mouvements des granules de sécrétion dans le cortex d’actine [Johns et al., 2001, Rudolf et al., 2001]. Les deux phénomènes sont parfois confondus, et sont difficile à étudier séparément.

La participation des protéines SNAREs (protéine de fusion des membranes, voir section 1.7.1 page 34) a souvent été proposée dans l’attachement à la membrane plasmique des granules de sécrétion. Cependant, l’inhibition de l’expression des protéines SNAREs ou leur clivage par des toxines n’empêche pas l’attachement et l’arrimage à la membrane plasmique, établissant que les SNAREs interviennent en aval des processus d’attachement et d’arrimage [Hunt et al., 1994, Broadie et al., 1995, O’Connor et al., 1997, Schoch et al., 2001, Washbourne et al., 2002, Sørensen et al., 2003, Borisovska et al., 2005]. Des résultats récents indiquent toutefois que la protéine SNARE SNAP 25 serait impliquée dans l’arrimage (voir section 1.6.4 page 28).

Cependant, *Toonen et al.* ont montré l’existence de périodes d’immobilisation courtes des granules de sécrétion à la membrane plasmique (<10s), et longues (>10s) confirmée par *Desnos et al.* [Desnos et al., 2007b]. Ces périodes d’immobilisations courtes passent par une machinerie protéique différente, puisque l’inhibition de l’expression de Munc 18 (protéine impliquée dans l’arrimage des granules à la membrane plasmique, voir section 1.6.4 page 28) affecte les périodes longues mais peu les courtes [Toonen et al., 2006].

Le mécanisme moléculaire et les acteurs de cet attachement court et réversible sont inconnus. La fonction de cet attachement l’est également. Est-ce une première étape avant l’arrimage à la membrane ou un phénomène différent ?

1.6.4 Arrimage à la membrane plasmique

Différentes définitions, différentes méthodes

L'arrimage à la membrane plasmique a deux définitions majeures :

Morphologie. La première est une définition morphologique issue des techniques de microscopie électronique. Sont considérés comme arrimés les granules de sécrétion en contact ou à proximité immédiate de la membrane plasmique (voir FIGURE 1.4.2 page 17). Cette définition permet une caractérisation fine du phénomène, même si le seuil de distance à partir duquel les granules sont considérés arrimés reste flou. Cependant, cette définition rend les études dynamiques impossibles.

Dans les cellules chromaffines, 30% des granules de sécrétion sont à moins de 50nm de la membrane plasmique. Cependant, en l'absence de structure ou morphologie claire marquant l'état d'arrimage, ce pourcentage est probablement surestimé. Il est alors nécessaire d'analyser la distribution des distances des granules à la membrane [Verhage and Sørensen, 2008].

Une autre difficulté vient de la méthode de fixation chimique des échantillons (fixation par des aldéhydes en général) qui ne préserve pas les structures labiles, comme le réseau de microtubules [Kiss et al., 1990]. Il est alors nécessaire d'avoir recours à des méthodes de fixation des échantillons rapide et à haute pression qui conservent les structures labiles, et permettent par exemple l'observation des réseaux de microtubules [Weimer et al., 2006]. Le nombre de vésicules synaptiques arrimées à la membrane plasmique mesurées dans les boutons présynaptiques dépend fortement de la méthode de fixation, suggérant que les méthodes de fixation chimique lente pourraient avoir une influence forte sur la distribution des vésicules synaptiques, et donc probablement des granules de sécrétion des cellules neuroendocrines également.

Dynamique. La deuxième est une définition dynamique caractérisant le mouvement des vésicules en imagerie à onde évanescente. Il existe différentes caractérisations de l'arrimage suivant les méthodes d'analyse.

Méthode de Huet et al. En observant la trajectoire des granules de sécrétion, quatre types de trajectoire ont pu être caractérisés :

- Mouvements dirigés : ce type de trajectoire montre une forte directionnalité et une vitesse de déplacement rapide. Ce type de mouvement, inhibé par le nocodazole (une drogue qui dépolymérise l'actine) est caractéristique des mouvements des granules de sécrétion le long des microtubules.
- Mouvements diffusifs : ce type de trajectoire ne présente pas de direction préférentielle, et les vitesses sont plus faibles que les mouvements dirigés. On attribue ce type de mouvement à une diffusion plus ou moins libre dans le cortex d'actine ou avec celui-ci.
- Mouvements contraints : ce type de trajectoire correspond à des mouvements centrés autour d'un point fixe, avec une faible liberté de mouvement. On attribue ce type de mouvement à un arrimage à la membrane plasmique (voir section 1.6.3 page 22).
- Immobilisation : les granules peuvent s'immobiliser un temps (de 1s à plus d'une minute). On considère que ces périodes d'immobilisations correspondent aux arrimages à la membrane plasmique.

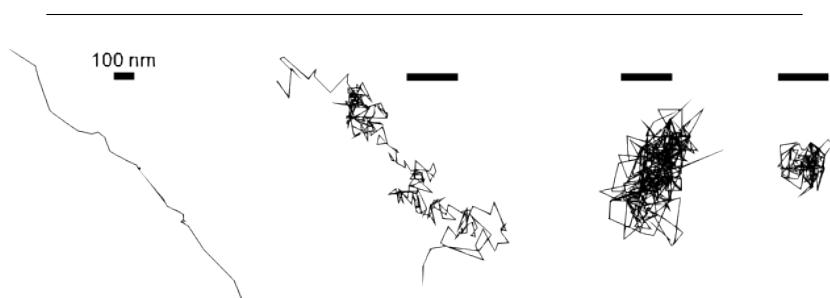


FIGURE 1.6 – Des granules de sécrétion ont été filmés en imagerie à onde évanescente dans les cellules chromaffines. Les granules ont été identifiés et suivis individuellement pour reconstruire leur trajectoire. De gauche à droite, mouvement dirigé, mouvement diffusif, mouvement contraint, immobilisation. Échelle 100nm.

Afin de déterminer un critère précis d'immobilisation, on peut calculer le coefficient de diffusion dans le plan focal (x,y) D_{xy} . Ce coefficient de

diffusion ne prend pas en compte la diffusion perpendiculaire au plan focal (z) qui est plus difficile d'accès en imagerie à onde évanescente. *Huet et al.* ont établi que lorsque le coefficient de diffusion D_{xy} était inférieur à $5.10^{-4}\mu\text{m}^2/\text{s}$, on pouvait considérer les granules de sécrétion comme arrimés [*Huet et al.*, 2006]. En effet, 95% des granules de sécrétion juste avant la fusion montrent un $D_{xy} < 5.10^{-4}\mu\text{m}^2/\text{s}$ [*Desnos et al.*, 2007b].

Nofal et al. identifient les mêmes types de trajectoires, mais considèrent que les granules immobiles sont les granules amorcés (voir section 1.7.1 page 34), et les granules ayant une trajectoire contrainte sont les granules arrimés. Cette caractérisation est basée sur l'observation de l'augmentation du nombre de granules immobiles lors de la sur-expression de Munc 13 (facteur d'amorçage) dans les cellules chromaffines. *Nofal et al.* utilisent une méthode de fenêtre glissante, et déterminent pour chaque intervalle de 6 secondes (détermination empirique afin d'obtenir un bon compromis entre bruit et précision) la distance maximale parcourue. La distribution de ces distances peut être ajustée à l'aide de 4 gaussiennes : la première correspond aux secousses du système, la deuxième correspond aux granules amorcés, la troisième aux granules arrimés, et la quatrième aux granules ayant un mouvement dirigé. L'inconvénient de cette méthode, c'est qu'elle ne permet pas d'identifier les mouvements diffusifs libres qui polluent probablement la 3ème et la 4ème gaussienne. De plus, l'augmentation du nombre de granules immobiles par sur-expression de Munc 13 suggère que les granules amorcés sont immobiles mais ça n'implique pas que les granules immobiles sont amorcés.

Toonen et al. suivent les granules de sécrétion dans les cellules chromaffines en 3 dimensions par imagerie à onde évanescente en utilisant l'intensité des granules comme indice de leur altitude. Ils en déduisent les temps de résidence à la membrane plasmique, et considèrent ces périodes comme des arrimages à la membrane plasmique. Les temps caractéristiques de ces périodes de résidence sont similaires à ceux obtenus par la caractérisation de la trajectoire de *Desnos et al.* [*Desnos et al.*, 2007b], avec des périodes courtes et des périodes longues. Les périodes courtes sont attribuées à l'attachement à la membrane plasmique (voir section 1.6.3 page 22) ainsi qu'à la diffusion lente dans le cortex d'actine, et les longues sont attribuées à l'arrimage. Les

périodes courtes peuvent cependant être des faux positifs dus à des mouvements diffusifs lents.

En utilisant ces deux définitions de l'arrimage, plusieurs effecteurs de l'arrimage à la membrane plasmique ont été identifiés : Munc 13, Munc 18 et la Syntaxine 1, les Rab GTPases (complexe Exocyste).

Rôle de Munc 13 dans l'arrimage à la membrane

Munc 13 joue un rôle important dans l'amorçage de la fusion (voir section 1.7.1 page 34). Elle intervient peut-être également dans l'arrimage. L'observation de l'arrimage par microscopie électronique révèle que Munc 13 joue un rôle dans l'arrimage des vésicules de sécrétion des acrosomes [Bello et al., 2012], ainsi que dans l'arrimage des vésicules synaptiques [Siksou et al., 2009]. Dans les lymphocytes T, la sur-expression de dominants négatifs de Munc 13 réduit la capacité des lysosomes à s'immobiliser dans la zone subplasmalemmale observée par imagerie à onde évanescente [Elstak et al., 2011]. Ce rôle de Munc 13 fait intervenir une interaction avec la Rab GTPase Rab27a, présente à la surface des vésicules de sécrétion.

Dans les cellules à insuline, Munc 13 est un partenaire de Rim2 α , qui est une protéine impliquée dans l'arrimage et l'amorçage de la fusion [Yasuda et al., 2010].

Munc 18 facilite l'arrimage des granules aux protéines SNARE Syntaxine 1 / SNAP 25

Sec1/Munc 18 est associé au complexe SNARE (voir section 1.7.1 page 34) et en particulier à la Syntaxine 1 qui est une protéine target-SNARE (t-SNARE) présente dans la membrane plasmique [Zilly et al., 2006, Dulubova et al., 2007].

Dans les cellules chromaffines mutantes n'exprimant pas Munc 18, l'exocytose mesurée par ampérométrie et par mesure de la capacité de la membrane plasmique est fortement diminuée. L'observation par microscopie électronique d'échantillons fixés chimiquement montre une diminution du nombre de granules arrimés à la membrane plasmique [Voets et al., 2001b]. Ces ré-

sultats ont été confirmés par *Toonen et al.* qui ont montré une réduction des périodes longues d'immobilisation des granules de sécrétion observés en imagerie à onde évanescence. Ces périodes longues, considérées comme l'arrimage des granules à la membrane plasmique dépendent également de la Syntaxine 1 [*Toonen et al., 2006*]. Il a également été montré l'implication de Munc 18 dans l'arrimage des granules à la membrane des cellules de l'hypophyse antérieure de souris [*Korteweg et al., 2005*].

Parallèlement, la délétion de la Syntaxine 1 par une toxine botulique diminue fortement le recrutement de Munc 18 à la membrane plasmique, ainsi que le nombre de granules de sécrétion arrimés à la membrane plasmique comptés par analyse morphologique d'images prises en microscopie électronique [*de Wit et al., 2006*].

La sur-expression d'un mutant de Munc 18 incapable de se lier à la Syntaxine 1 dans des cellules chromaffines déficientes en Munc 18 ne permet pas de restaurer le phénotype sauvage d'arrimage [*Gulyás-Kovács et al., 2007*]. Cependant, si on sur-exprime SNAP-25 (une protéine SNARE qui se lie à la Syntaxine 1) dans ces cellules, on peut restaurer partiellement le phénotype d'arrimage des granules, de même que si on sur-exprime le fragment C-terminal de la Synaptobrevine 2 qui stabilise le complexe Syntaxine 1 / SNAP 25.

Dans des cellules chromaffines n'exprimant pas SNAP 25, l'arrimage des granules est fortement diminué [*de Wit et al., 2009*]. Cette observation contredit cependant des observations précédentes [*Sørensen et al., 2003*].

Ces données suggèrent que Munc 18 stabilise le complexe Syntaxine 1 / SNAP 25 auquel peuvent s'arrimer les granules de sécrétion. Munc 18 pourrait jouer le rôle de chaperon et contrôler les transitions entre les différentes formes du complexe et éviter la formation des complexes « inertes » (voir FIGURE 1.6.4 page suivante).

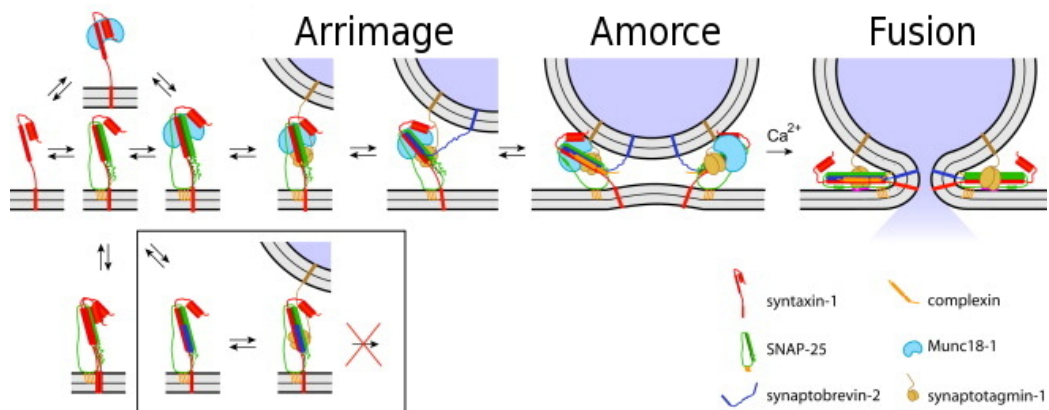


FIGURE 1.7 – Modèle de l'exocytose impliquant Munc 18 (bleu clair) / Syntaxine 1 (rouge) / SNAP 25 (vert). La fusion finale des membranes implique également la Synaptobrévine 2 / VAMP 2 (bleu foncé) (voir section 1.7.1 page 34). La ligne du bas indique les complexes protéiques non processifs qui ne mènent pas à la fusion : soit parce qu'ils intègrent 2 Syntaxines pour 1 SNAP 25 (en bas à gauche), soit par formation d'un complexe SNARE trimérique avec ou sans la Syntaxine 1 (en bas à droite). Munc 18 stabilise le complexe SNARE dans sa forme fusogène. (Source : [de Wit et al., 2009])

Les Rab GTPases , une famille impliquée dans l'arrimage

Les Rab GTPases sont des petites GTPases appartenant à la superfamille Ras. Plusieurs de ces protéines interviennent en tant que facteur d'arrimage à la membrane plasmique [Waters and Pfeffer, 1999]. Les Rab GTPases peuvent être dans deux états :

- inactif, lié à de la guanosine di-phosphate (GDP), dans le cytoplasme ;
- actif, lié à de la guanosine tri-phosphate (GTP), à la membrane de différents compartiments intracellulaires.

Sous leur forme activée, les Rab peuvent recruter des effecteurs impliqués dans l'arrimage à la membrane plasmique. Rab27 et ses effecteurs ont été identifiés comme participants au recrutement des vésicules de sécrétion à la membrane plasmique [Desnos et al., 2007b, Nonet et al., 1997, Tsuboi and Fukuda, 2006]. Rab3 a été proposé pour participer au recrutement, mais les données restent floues.

Certains effecteurs de ces protéines Rabs (Myrip pour Rab27, synapsine pour Rab3) peuvent interagir avec l'actine, ce qui pourrait jouer un rôle dans la rétention des granules des sécrétion dans le cortex d'actine.

Rab3 L'arrimage des vésicules de sécrétion est perturbé à la jonction neuromusculaire des souris déficientes en Rab3 [Coleman et al., 2007], ainsi que dans les cellules PC12 qui sur-expriment des dominants négatifs de Rab3 (Rab3a et Rab3d) [Martelli et al., 2000]. De plus, la sur-expression de Rab3 augmente l'arrimage dans les cellules PC12 [Martelli et al., 2000] et dans les cellules chromaffines [van Weering et al., 2007]. En revanche, ce résultat n'a pas été répliqué dans les cellules chromaffines n'exprimant aucune des isoforme de Rab3 (a,b,c et d) [Schonn et al., 2010] : la biogenèse des granules ainsi que l'amorçage de la fusion semblent affectés, mais pas le nombre de granules arrimés à la membrane plasmique. L'exocytose du groupe rapidement libérable semble diminuée dans ces cellules, mais pas celle du groupe de réserve. Ceci pourrait être expliqué par une coopération entre Rab3 et Rab27. En effet, dans les cellules PC12, l'inhibition de l'expression de Rab3 ou de Rab27 diminue le nombre de granules arrimés, et l'inhibition des deux le diminue encore plus [Tsuboi and Fukuda, 2006]. Cependant, ces observations ne permettent pas de donner une réponse définitive sur le rôle de Rab3 dans l'arrimage.

Un des effecteurs de Rab3 est Rim [Darchen and Desnos, 2012]. *Kiyonaka et al.* ont montré une interaction entre Rim1 et les canaux calciques voltage dépendants [Kiyonaka et al., 2007]. La sur-expression de Rim1 ou de son extrémité C-terminale dans les cellules PC12 augmente la libération d'acétylcholine. Cette interaction entre Rim1 et les canaux calciques pourrait permettre d'arrimer les granules auprès de ces derniers.

Rab27 L'injection d'anticorps reconnaissant Rab27 dans les neurones géants de calmar diminue le nombre de vésicules synaptiques arrimées à la membrane plasmique imagées par microscopie électronique [Yu et al., 2008]. L'observation des cellules endocrines de la glande surrénale n'exprimant ni Rab27a, ni Rab27b, en microscopie électronique révèle une redistribution des gra-

nules de sécrétion suggérant une perturbation de l'arrimage à la membrane [Gomi et al., 2007]. Rab27 intervient également dans l'arrimage des vésicules lytiques des lymphocytes T [Stinchcombe et al., 2001].

Rab27 et ses effecteurs seront traités plus en détails dans la section 2.1.1 page 87.

Le complexe Exocyste, un effecteur de l'arrimage recruté par Ral

L'Exocyste est un complexe octamérique initialement identifié chez la levure [Hsu et al., 2004, Novick et al., 1980, Novick and Schekman, 1979, TerBush et al., 1996]. Ce complexe montre une conservation au cours de l'évolution. Six des sous-unités sont associées aux vésicules de sécrétion (Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15 et Exo84). Les deux autres sont associées à la membrane plasmique (Exo70 et Sec3). On le retrouve impliqué dans différents phénomènes : polarisation cellulaire, la synaptogénèse, ou l'exocytose polarisée [Hsu et al., 2004].

Ce complexe est l'effecteur de différentes GTPases de différentes familles : Rab [Guo et al., 1999], Rho [Adamo et al., 1999, Robinson et al., 1999, Guo et al., 2001, Zhang et al., 2001, Wu et al., 2010, Moore et al., 2007], Ral [Brymora et al., 2001, Moskalenko et al., 2002, Sugihara et al., 2002, Polzin et al., 2002].

Ce complexe peut s'associer aux granules de sécrétion via sa sous-unité Sec5 et la petite GTPase Ral, membre de la famille des Ras. La perturbation de l'interaction Ral1 / Exocyste inhibe l'exocytose dans les cellules neuro-endocrines (voir FIGURE 1.6.4 page ci-contre) [Moskalenko et al., 2002]. Cependant, le rôle des sous-unités et de leur interaction avec les petites GTPases reste peu clair.

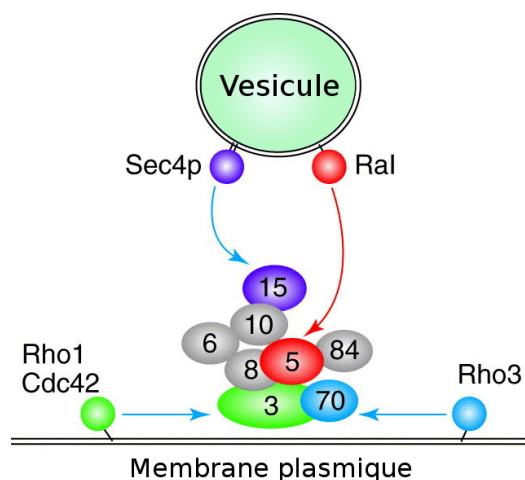


FIGURE 1.8 – Résumé des interactions du complexe Exocyste et des petites GTPases Rho, Rab, et Ral. Chez la levure, la Sec4p (Rab) interagit avec la protéine de l'Exocyste Sec15p, située sur la vésicule de sécrétion; Rho1 et Cdc42 (Rho) interagissent avec la protéine de l'Exocyste Sec3p; Rho3 interagit avec Exo70p. Chez les mammifères, Ral interagit avec la protéine de l'Exocyste Sec5p. Cdc42 et Rho3 interagissent également avec Exo70 [Wu et al., 2010]. (Source : [Novick and Guo, 2002])

L'ensemble de ces protéines : Munc 18, Syntaxine 1, SNAP 25, Rab27, et l'Exocyste jouent un rôle dans l'arrimage plasmique bien que leurs rôles exacts et leurs interactions restent encore peu clairs. Une fois les granules de sécrétion arrimés à la membrane plasmique, ils vont passer par l'étape d'amorçage de la fusion. Cette étape leur donne alors la capacité de fusionner en réponse à un stimulus, et ils sont alors considérés comme faisant partie du groupe rapidement libérable.

1.7 Fusion des membranes

La fusion des membranes dans la cellule est un processus étroitement régulé. La diversité des organites de la cellule, et le nombre de processus totalement différents impliquant des fusion de membrane (exocytose constitutive, exocytose régulée, maturation des granules, autophagie, catalyse lysosomale, ...) nécessite de pouvoir favoriser la fusion de certaines membranes

et d'empêcher la fusion d'autres. Les protéines SNAREs « **SNAP** (Soluble NSF Attachment Protein) **RE**ceptor » interviennent dans la fusion des membranes en formant un complexe. C'est la formation de ce complexe qui est régulée par différents effecteurs afin d'assurer la spécificité des fusions.

1.7.1 Amorçage des vésicules de sécrétion à la fusion

L'amorçage de la fusion des granules de sécrétion constitue l'étape après l'arrimage et avant la fusion. Elle représente essentiellement la formation du complexe SNARE, mais certaines données suggèrent également que l'association des vésicules de sécrétion avec les canaux calciques, qui sont activés lors d'un stimulus et permettent l'influx de calcium dans la cellule, participe au couplage stimulus / sécrétion.

Les protéines SNAREs

Complexe SNARE

On peut décrire les processus de trafic des organites destinés à fusionner de la façon suivante : les organites de fusion bourgeonnent d'un compartiment donneur, sont transportés jusqu'à la membrane cible et fusionnent avec cette membrane cible. Cette fusion requiert l'assemblage d'un complexe impliquant une protéine SNARE ancrée dans la membrane de la vésicule « v-SNARE » (vesicular-SNARE), et des protéines SNAREs ancrées dans la membrane cible « t-SNARE » (target-SNARE) (voir **FIGURE 1.7.1** page suivante). Il est proposé que ce complexe *trans*-SNARE appelé également appelé « SNAREpin » permette le rapprochement des deux membranes [**Jahn and Grubmüller, 2002, Jahn and Scheller, 2006, Sutton et al., 1998**]. Les protéines SNAREs peuvent également former un complexe *cis*-SNARE dans une seule membrane non fonctionnelle, typique du complexe post-fusion.

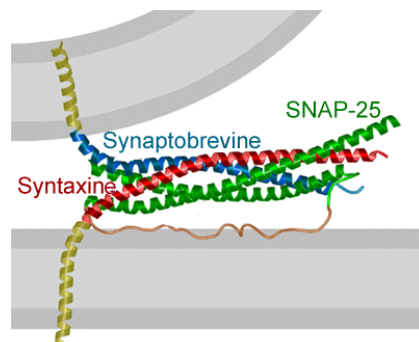


FIGURE 1.9 – Complexe SNARE « neural » constitué de la v-SNARE (Synaptobrevine 2 / VAMP 2), et des deux t-SNAREs (Syntaxine 1 et SNAP 25). La bande grise inférieure représente la membrane plasmique et la supérieure la membrane de la vésicule synaptique. (Source : [Sutton et al., 1998])

La découverte d'une famille très répandue. Les protéines SNAREs ont été découvertes dans les années 90 [Söllner et al., 1993a, Söllner et al., 1993b]. Trois protéines membranaires présentes dans la synapse des neurones ont été identifiées : la Synaptobrevine 2 (Syb2), la Syntaxine 1 and SNAP 25 (voir FIGURE 1.7.1). Ces trois protéines interagissent avec NSF [Block et al., 1988], impliquée dans le transport vésiculaire et qui interagit avec les protéines SNAP (α et γ).

De nombreuses autres protéines SNAREs ont été découvertes ensuite. La famille des protéines SNARE est impliquée dans de nombreux processus de fusion des membranes intracellulaires [Jahn and Scheller, 2006]. Elles sont très répandues (voir la revue [Hong, 2005]) :

- Chez les végétaux : plus de 50 membres identifiés.
- Chez les mammifères : 36 membres identifiés.
- Chez la levure : 25 membres identifiés.

Structure des protéines SNAREs. Les protéines SNARE sont petites (100 à 300 acides aminés). Elles ont des séquences très différentes, mais possèdent toutes un domaine conservé : le motif SNARE [Brunger, 2005].

Ce motif est constitué de 60 à 70 acides aminés, et est constitué de huit répétitions d'une séquence de 7 acides aminés (heptamère) [Fasshauer

et al., 1998]. Le premier et le quatrième acide aminé de ces heptamères sont hydrophobes, ce qui est caractéristique des protéines pouvant former des interactions hélice-hélice [Lupas et al., 1991].

La plupart des protéines SNARE (31 sur 36) sont ancrées dans leur membrane par un domaine trans-membranaire proche de l'extrémité C-terminale. Les autres SNAREs (SNAP 23, SNAP 25, SNAP 29, Syn 11 and Ykt 6) sont liées à la membrane plasmique par prénylation, , par palmitoylation, ou par l'interaction avec d'autres protéines SNAREs [Fukasawa et al., 2004, Prekeris et al., 2000, Veit et al., 1996, Vogel et al., 2000].

En général, il y a deux ou trois protéines t-SNAREs [Fukuda et al., 2000] impliquées dans le complexe. Un membre de la famille des Syntaxines fournit un motif SNARE, tandis qu'un membre de la famille de SNAP 25 en fournit deux. Le complexe SNARE se forme par interaction des domaines SNAREs qui commence par les extrémités N-terminales, puis se « zippent » à la manière d'une fermeture éclair. Au cours de ce processus, les 4 domaines SNAREs, peu structurés, s'organisent alors en un fagot de 4 hélices parallèles très organisé. Cette organisation pourrait libérer une quantité d'énergie suffisante pour rapprocher les deux membranes. En effet, cette étape présente une barrière d'énergie due à la répulsion électrostatique des charges négatives des têtes hydrophiles des lipides qui composent la membrane, la déshydratation des têtes polaires des lipides, ainsi qu'à la répulsion due aux ondulations des membranes.

Le complexe SNARE peut-être formé également de façon antiparallèle. Cette forme ne permet pas la fusion, seule la forme *trans* est fusogène [Hay and Martin, 1992]. Il n'a pas été prouvé formellement que le complexe *trans* se forme avant la stimulation et l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire. Le moment de la formation du complexe reste débattu. Deux hypothèses sont proposées : la première conjecture que le complexe se forme avant l'étape d'amorçage de la fusion. Il est donc nécessaire d'interrompre le processus avant la fusion. Le complexe SNARE pourrait s'apparier de façon incomplète impliquant l'intervention de régulateurs négatifs. La complexine est proposée pour ce rôle [Li et al., 2011, Hua and Charlton, 1999, Sørensen et al., 2006, Xu et al., 1999]. L'autre hypothèse propose que le complexe

SNARE soit formé juste avant la fusion [Hernandez et al., 2012]. Il est alors nécessaire de mettre des étapes de régulation en amont de la formation du complexe SNARE.

La variété des protéines SNAREs dans les différents compartiments laissait penser que les SNAREs assureraient la spécificité de la fusion, et permettait à certains compartiments de fusionner et pas à d'autres [Rothman and Warren, 1994]. Cependant, il apparaît que les protéines SNAREs apparentées et non-apparentées sont très similaires les unes aux autres quant à leurs propriétés biophysiques, leur assemblage et leur désassemblage [Brandhorst et al., 2006, Fasshauer et al., 1999]. Les SNAREs de la même sous-famille peuvent se substituer les unes aux autres : la sur-expression de SNAP 23 dans les chromaffines de souris déficientes pour SNAP 25 peut restaurer le phénotype de l'exocytose [Sørensen et al., 2003]. Il est donc probable que d'autres facteurs (arrimage, régulateurs du complexe SNARE) contrôlent la spécificité de la tension membranaire.

Le complexe SNARE synaptique. De nombreux complexes SNAREs ont été identifiés, mais le mieux caractérisé et étudié est le complexe SNARE synaptique qui intervient dans la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique des neurones. Ce complexe est constitué de la Synaptobrevine 2, de la Syntaxine 1, et de SNAP 25. Ce complexe sert de modèle pour les phénomènes de fusion (voir les revues [Jahn and Grubmüller, 2002, Sudhof, 2004]).

La Synaptobrevine 2 possède 118 acides aminés, et est fortement exprimée dans les neurones sympathiques, dans les neurones sensoriels et dans les cellules neuro-endocrines. Dans ces cellules, on la retrouve localisée sur les vésicules synaptiques ou sur les granules de sécrétion [Baumert et al., 1989], et jusqu'à 60 copies ont été trouvées sur les vésicules synaptiques [Baumert et al., 1989]. Elle est ancrée dans la vésicule de sécrétion par son domaine trans-membranaire proche de l'extrémité C-terminale. Cette ancre est reliée au domaine SNARE par un lien contenant des cystéines pouvant être palmitoylées. L'extrémité N-terminale est formée par le domaine SNARE

avec une courte extension enrichie en prolines.

La Syntaxine 1 possède 288 acides aminés, et est exprimée dans les cellules neuronales [Bennett et al., 1992] et les cellules neuro-endocrines [Söllner et al., 1993a]. Elle a une structure typique des SNAREs : un domaine C-terminal hydrophobe ancré dans la membrane plasmique, le domaine SNARE, et une extrémité N-terminale structurée indépendante. Cette extrémité N-terminale est constituée de 120 acides aminés organisés en un fagot de 3 hélices. Ce domaine peut se replier sur le domaine SNARE et donner lieu à la conformation « fermée » de la Syntaxine 1 [Margittai et al., 2003]. Cette conformation est stabilisée par la présence de Munc 18, et rend la formation du complexe SNARE impossible. Cette interaction peut-être levée par le recrutement de Munc 13, menant à l'« ouverture » de la Syntaxine 1 (voir FIGURE 1.7.1).

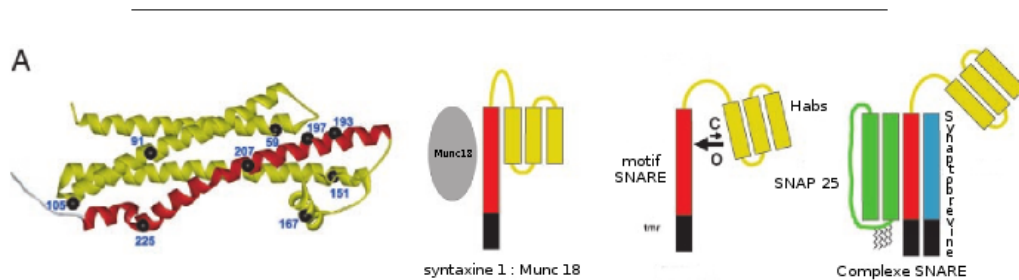


FIGURE 1.10 – **À gauche**, modèle de l'interaction entre les trois hélices du domaine N-terminal (jaune) et le domaine SNARE (rouge) de la Syntaxine 1. **À droite**, modèle de l'ouverture de la Syntaxine 1 : la Syntaxine 1 est fermée par l'interaction du domaine SNARE et des trois hélices (Ha, Hb, et Hc) du domaine N-terminal, stabilisée par Munc 18 (gris). Le déplacement de Munc 18 permet l'ouverture de la Syntaxine 1 et l'assemblage du complexe SNARE par recrutement de SNAP 25 (vert) et de la Synaptobrévine 2 (bleu). (Source : [Margittai et al., 2003])

SNAP 25 (Soluble NSF Attachment Protein 25) possède 208 acides aminés. Elle est localisée à la membrane plasmique, et co-localise avec la Syntaxine 1 [Söllner et al., 1993a]. SNAP 25 possède deux domaines SNAREs contrairement à la plupart des autres protéines de la famille. Ces deux motifs SNARE sont liés par une région flexible. SNAP 25 est dépourvue de domaine trans-membranaire. C'est la région souple qui assure l'ancrage à la membrane plasmique au travers de 4 cystéines palmitoylées.

Une certaine proportion de la Syntaxine 1 et de SNAP 25 est localisée sur les vésicules de sécrétion. Cette localisation est sans doute due au recyclage des vésicules après fusion (voir section 1.8 page 67).

Structure du complexe SNARE — L'étude *in vitro* du complexe SNARE a été rendue possible par l'expression de SNAREs recombinantes dont la partie trans-membranaire C-terminale a été supprimée et fusionnée à la glutathione S transférase (GST) [Hayashi et al., 1995]. En étudiant les protéines deux à deux, cette technique a permis de montrer que la Synaptobrevine 2 formait des liaisons faibles avec chacun de ses partenaires. En revanche ses partenaires, la Syntaxine 1 et SNAP 25, sont capables de former un complexe stable. Lorsque les trois protéines sont mises en présence les unes des autres, elles forment un complexe extrêmement stable qui résiste au sulfate de dodecyle sodium (SDS), et à des températures jusqu'à 85°C [Fasshauer et al., 2002, Fasshauer et al., 1997b].

Pour suivre les changements de conformations des protéines lors de la formation du complexe, Fasshauer et al. ont utilisé la spectroscopie par dichroïsme circulaire. Seul le domaine N-terminal de la Syntaxine 1 est structuré, contrairement à celui de la Synaptobrevine 2 et de SNAP 25. La formation du complexe Syntaxine 1 / SNAP 25 augmente le nombre de structures en hélice α . L'organisation du domaine N-terminal de SNAP 25 requiert donc l'interaction avec le domaine déjà organisé de la Syntaxine 1 [Fasshauer et al., 1997a]. De même, le domaine N-terminale de la Synaptobrevine 2 s'organise grâce à l'interaction avec le complexe Syntaxine 1 / SNAP 25 [Fasshauer et al., 1997b].

La formation du complexe se fait donc par la formation d'un fagot de

quatre hélices α parallèles, en commençant par l'extrémité N-terminale. Le modèle « fermeture éclair » propose que l'interaction inter-chaîne se propage vers l'extrémité C-terminale des motifs SNARE, rapprochant ainsi les membranes.

La formation de ce complexe qui constitue l'étape d'amorçage de la fusion est toutefois très régulée, afin de répondre à la nécessité de la sélectivité des compartiments pouvant fusionner.

Régulation de la formation du complexe SNARE

Les régulateurs de la formation du complexe SNARE sont très nombreux. Voici certains des plus importants :

Domaine N-terminal de la Synaptobrévine 2 et de SNAP 25 —

La modification de l'extrémité N-terminale de la Synaptobrévine 2 enrichie en prolines altère la taille du groupe de granules de sécrétion rapidement libérables [Borisovska et al., 2005], ce qui suggère que cette extrémité joue un rôle important dans l'amorçage de la fusion et la formation du complexe SNARE.

Dans des neurones d'hippocampe de souris n'exprimant pas SNAP 25, mais sur-exprimant un mutant de SNAP 25 court dont l'extrémité N-terminale manque, le nombre de vésicules rapidement libérables est diminué [Weber et al., 2010]. Des résultats similaires sont obtenus dans les cellules neuro-endocrines [Walter et al., 2010]. Le domaine N-terminal de SNAP 25 joue donc également un rôle dans l'amorçage à la fusion.

Ces résultats soutiennent l'hypothèse de la « fermeture éclair », puisque l'amorçage de la fusion, donc la formation initiale du complexe SNARE semble dépendre de l'extrémité N-terminale.

Le domaine N-terminal de certaines t-SNAREs (Ti-VAMP / VAMP 7) appelé « longin » régule négativement la formation du complexe SNARE, probablement par une liaison intra-moléculaire sur le domaine SNARE [Nicholson et al., 1998, Parlati et al., 1999, Martinez-Arca et al., 2000]. Cette régulation négative pourrait ressembler à celle de l'extrémité N-terminale de

la Syntaxine 1 (voir section 1.7.1 page 38) bien que la structure de ce domaine soit différente de celle du domaine « longin » de Ti-VAMP.

Munc 13 et Munc 18 — La famille Munc 13 (Munc 13-1, -2, et -3) a un rôle central dans l’amorçage de la fusion des vésicules synaptiques [Augustin et al., 1999, Varoqueaux et al., 2002]. Munc 13-1 se lie avec la Syntaxine 1 [Betz et al., 1997]. Le domaine d’interaction de Munc 13 / Syntaxine 1 recouvre celui de Munc 18 / Syntaxine 1, suggérant que Munc 13 et Munc 18 sont en compétition pour la liaison avec la Syntaxine 1. Munc 18 ne peut se lier qu’à la forme fermée de la Syntaxine 1, conformation dans laquelle la formation du complexe SNARE est impossible. La liaison de Munc 13 pourrait alors permettre le déplacement de Munc 18, l’ouverture de la Syntaxine 1 et la formation du complexe SNARE, donc l’amorçage à la fusion [Sassa et al., 1999].

Cependant, des observations plus récentes contredisent ce modèle. *Han et Jackson* ont montré que la sur-expression d’un mutant de la Syntaxine (ΔH_{abc}) à qui il manque le domaine N-terminal permettant la conformation fermée (voir section 1.7.1 page 38 et FIGURE 1.7.1 page 38) dans les cellules PC12 diminuait la fréquence initiale de l’exocytose comparée à la sur-expression de la Syntaxine 1 sauvage. Les auteurs ont également utilisé un mutant de la Syntaxine dans lequel le domaine de liaison avec Munc 18 a été modifié, réduisant l’interaction avec Munc 18. Ce mutant favoriserait donc la forme ouverte. La sur-expression de ce mutant dans les cellules PC12 réduit également l’exocytose. Ces données suggèrent que la forme fermée de la Syntaxine est importante pour l’exocytose et l’amorçage de la fusion, et ne joue sans doute pas un rôle inhibiteur.

Les différents orthologues de Munc 18 jouent un rôle dans la régulation de la formation du complexe SNARE [Toonen and Verhage, 2007]. L’inhibition de l’expression de Sec 1 chez la levure, Unc 18 chez *C. Elegans*, Rop chez la Drosophile, réduit l’exocytose. Les embryons de souris mutantes n’exprimant pas Munc 18-1 se développent, mais meurent à la naissance, incapables de respirer [Verhage et al., 2000]. La libération de neurotransmetteurs est bloquée chez ces souris pendant le développement.

In vitro, il a été montré que Munc 18 favorise l'adhésion et la fusion de deux groupes de vésicules portant des protéines t-SNARE et v-SNARE respectivement. Il est proposé que Munc 18 agisse comme un inhibiteur ou un effecteur de l'exocytose (voir section 1.7.1 page précédente). Munc 18 peut se lier à la Syntaxine 1 sous sa forme fermée, mais également sous sa forme ouverte [Rickman et al., 2007], *in vitro*. Cette interaction avec les deux conformations de la Syntaxine 1 a également été observée dans les neuroblastomes.

Munc 18 pourrait également servir de protéine d'arrimage des granules de sécrétion (voir section 1.6.4 page 28), en interagissant avec la Syntaxine 1 [Dulubova et al., 2007]. La réorganisation de ce complexe pourrait permettre le recrutement de SNAP 25, puis de la Synaptobrevine 2. Cette réorganisation ferait intervenir d'autres facteurs puisque Munc 18 ne semble pas capable de promouvoir la formation du complexe SNARE *in vitro*.

Un autre modèle est proposé par Zilly et al. qui observent la formation du complexe Syntaxine 1 / SNAP 25 sur des membranes retournées de PC12 lors de l'ajout de Munc 18. Munc 18 pourrait alors séquestrer la Syntaxine 1 afin de permettre la formation du complexe Syntaxine 1 / SNAP 25 dans un rapport 1 : 1 et non 2 : 1 qui est non fonctionnel (voir FIGURE 1.6.4 page 30).

La complexine — La complexine est une protéine capable de se lier rapidement et avec une forte affinité au complexe SNARE [Chen et al., 2002, McMahon et al., 1995, Pabst et al., 2000, Pabst et al., 2002, Takahashi et al., 1995]. Cette liaison dépend de la présence de calcium.

La complexine était initialement considérée comme un régulateur négatif de fusion. En effet, dans les cellules chromaffines, la sur-expression de la complexine provoque la fermeture prématurée du pore de fusion (voir section 1.7.3 page 50) [Archer et al., 2002]. Cet effet inhibiteur est confirmé dans les cellules PC12 qui sur-expriment la complexine 1 ou 2 [Itakura et al., 1999], ou dans les neurones d'*Aplysia* micro-injectés avec de la complexine 2 [Ono et al., 1998]. Le rôle de régulateur négatif a également été confirmé chez la *Drosophile* : les mutants n'exprimant pas la complexine ont une diminution de l'exocytose régulée et une forte augmentation de l'exocytose spontanée

[[Huntwork and Littleton, 2007](#)].

Cependant, certaines données récentes suggèrent que la complexine joue un rôle positif dans l'exocytose. Dans les neurones de souris, la perte de la complexine 1 ou 2 réduit l'exocytose régulée, mais ne change pas l'exocytose spontanée, ni le nombre de vésicules synaptiques rapidement libérables [[Reim et al., 2001](#)]. L'inhibition de l'expression de la complexine dans les cellules pancréatiques β ou les mastocytes réduit l'exocytose régulée [[Abderrahmani et al., 2004](#), [Tadokoro et al., 2005](#)]. *Cai et al.* ont montré également que la complexine a un effet positif sur l'exocytose, et joue un rôle dans la régulation de la taille du groupe rapidement mobilisable et du groupe de réserve dans les cellules chromaffines [[Cai et al., 2008](#)].

Dans les neurones d'hippocampe n'exprimant pas la complexine, l'exocytose est diminuée [[Xue et al., 2010](#), [Xue et al., 2007](#)]. Le phénotype peut être restauré par la sur-expression de complexine. La restauration du phénotype ne fonctionne pas avec un mutant de la complexine dont le domaine d'interaction avec le complexe SNARE est muté. Cette donnée révèle un rôle positif de la complexine dans l'exocytose passant par l'interaction avec le complexe SNARE. Cependant, lorsqu'on essaye de restaurer le phénotype avec un mutant dont l'extrémité N-terminale a été partiellement retirée, les neurones ont un phénotype encore plus sévère que le contrôle sans complexine. La complexine a donc également un rôle négatif sur l'exocytose. Ce double rôle a été confirmé par des expériences d'imagerie à onde évanescente mettant en évidence un rôle positif de la complexine sur l'exocytose à basse concentration, et un rôle négatif à haute concentration [[An et al., 2010](#)].

La clé de ce double rôle semble avoir été découverte récemment. L'utilisation de mesures d'énergie de la formation du complexe SNARE à l'aide de protéines SNARE fixées sur des billes prisonnières d'un piège optique en présence de complexine révèle que la complexine facilite la formation du complexe SNARE jusqu'à la moitié. La complexine interrompt alors l'association des protéines SNARE [[Li et al., 2011](#)]. De plus, dans cette conformation, la complexine promeut l'association à d'autres complexes SNARE formant une structure en « zig-zag » [[Kümmel et al., 2011](#)]. Ces données sont confirmées par l'étude *in vitro* de la fusion de vésicules artificielles, montrant que la

complexine a un rôle séquentiel [Malsam et al., 2012]. La complexine :

- favorise l’arrimage des vésicules artificielles les unes aux autres,
- bloque la fusion entre les vésicules artificielles provoquant l’accumulation de vésicules arrimées les unes aux autres,
- se synchronise avec la Synaptotagmine 1 (voir section 1.7.2 page 46) et stimule la fusion rapide des vésicules en présence de calcium à des concentrations physiologiques.

Le rôle de la complexine est donc à la fois de participer à l’amorçage de la fusion, puisqu’elle aide la formation du complexe SNARE, mais participe également à la fusion des membranes en contribuant à la régulation par le calcium de la fusion, puisqu’elle bloque la formation complète du complexe SNARE en l’absence de calcium.

La tomosyne — La tomosyne est un partenaire de la Syntaxine 1. Elle inhibe l’amorçage à la fusion dans les cellules neuro-endocrines et dans les neurones [Baba et al., 2005, Dybbs et al., 2005, McEwen et al., 2006, Yizhar et al., 2004] (voir la revue [Ashery et al., 2009]). La tomosyne est capable de déplacer Munc 18 de la Syntaxine 1 (voir section 1.6.4 page 28) afin de permettre la formation du complexe Syntaxine 1 / SNAP 25 / Synaptobrévine 2. L’absence de tomosyne 1 dans les nématodes augmente la quantité de vésicules synaptiques arrimées à la membrane plasmique [Gracheva et al., 2010]. Le rôle de la tomosyne est ambigu, et a été rapporté comme ayant des effets positifs ou négatifs sur l’exocytose (cellule β chez la souris [Zhang et al., 2006], cellules sécrétrices d’insuline [Cheviet et al., 2006]).

CAPS — La protéine CAPS 1 (Calcium-dependant Activator Protein for Secretion 1) interagit avec le complexe SNARE, en particulier avec la Syntaxine 1 et SNAP 25, et dans une moindre mesure avec la Synaptobrévine 2 [Daily et al., 2010]. Le domaine d’interaction de CAPS sur la Syntaxine 1 ne recouvre pas celui de Munc 18, les deux protéines peuvent donc être fixées en même temps sur la Syntaxine 1. Dans les cellules PC12, il a été montré que CAPS était impliquée dans l’amorçage de la fusion [Fujita et al., 2007]. Ces résultats ont été confirmés dans les cellules chromaffines. De plus, le défaut

dans la réserve rapidement libérable des granules de sécrétion des cellules chromaffines n'exprimant ni CAPS 1 ni CAPS 2 peut être restauré par la sur-expression d'une des deux isoformes, ainsi que par la forme ouverte de la Syntaxine 1, mais pas par Munc 13, suggérant que CAPS est un effecteur aval de Munc 13 [Liu et al., 2010].

La snapine — Les mutants des cellules chromaffines n'exprimant pas la snapine voient leur exocytose régulée diminuer, due à une diminution de la taille du groupe de granules de sécrétion rapidement libérables [Tian et al., 2005]. La snapine joue donc un rôle dans l'amorçage de la fusion, en interagissant avec SNAP 25. La snapine intervient dans la synchronisation de la fusion des différentes vésicules synaptiques dans les neurones corticaux de souris ainsi que dans l'amorçage de la fusion [Pan et al., 2009].

La snapine est également impliquée dans d'autres voies, comme l'autophagie, ou le trafic endo-lysosomal.

L'amorçage ATP-dépendante — NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) est une ATPase. Associée à son co-facteur SNAP (Soluble NSF Attachment Protein), elles peuvent se lier au complexe *cis*-SNARE (complexe non fonctionnel, voir section 1.7.1 page 34) et le désassembler, permettant son éventuelle re-formation sous la forme fonctionnelle *trans* [Banerjee et al., 1996, Söllner et al., 1993a, Weber et al., 2000].

Le processus d'amorçage de la fusion ATP-dépendante implique la synthèse de lipides comme le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PI(4,5)P₂). La synthèse de PI(4,5)P₂ est réalisée par l'action successive de deux protéines : la phosphatidylinositol transférase (phosphatidylinositol transfer protein, PITP), puis la phosphatidylinositol-4-phosphate-5-kinase (PIP5K) [Hay and Martin, 1993]. L'inhibition de l'expression de PIP5K diminue l'exocytose dans les cellules sécrétrices d'insuline [Waselle et al., 2005]. L'utilisation de techniques d'électrophysiologie a permis de révéler que PI(4,5)P₂ régule le nombre de vésicules dans le groupe rapidement libérable, révélant son rôle important dans l'amorçage de la fusion [Milosevic et al., 2005]. PI(4,5)P₂ pourrait jouer un rôle dans le recrutement de protéines comme la Synapto-

tagmine, CAPS 1, Munc 13.

La synthèse de PI(4,5)P₂ est localisée ce qui conduit à la formation de micro-domaines qui sont co-localisés avec les granules de sécrétion dans les cellules PC12 [Aoyagi et al., 2005]. Ces micro-domaines participent également au recrutement de la Syntaxine 1 et promeuvent la fusion des membranes [James et al., 2008].

Rab GTPases Les Rab GTPases, Rab3 et Rab27, qui interviennent dans l'arrimage à la membrane section 1.6.4 page 30, jouent également un rôle dans l'amorçage de la fusion [Desnos et al., 2003].

Dans les cellules PC12, Rab3 est couplé à l'activation de Munc 13 via l'effecteur de Rab3, Rim. Munc 18 apparaît alors comme un effecteur aval du système Munc 13 / Rim / Rab3 [Huang et al., 2011].

Rab27 semble avoir un effet positif sur l'arrimage des granules à la membrane dans les cellules à insuline, mais un effet négatif sur l'amorçage de la fusion [Merrins and Stuenkel, 2008].

1.7.2 Déclencheur de la fusion : la Synaptotagmine

Bien que ce soit encore matière à débat, il est communément admis que le complexe SNARE assemblé partiellement soit en attente de l'arrivée d'un stimulus déclenchant un influx de calcium qui va provoquer l'assemblage complet du complexe et la fusion des membranes.

L'exocytose régulée est déclenchée par un influx de calcium lors de la stimulation. Il y a donc nécessairement au moins une protéine capable de détecter le calcium.

La famille des Synaptotagmines, et en particulier la Synaptotagmine 1, sont de bons candidats (voir les revues [Koh and Bellen, 2003, Sudhof, 2004, Sørensen, 2009]).

La Synaptotagmine 1 est ancrée dans la membrane des granules de sécrétion par son domaine trans-membranaire N-terminale. L'ancre est suivie d'une séquence de liaison, puis deux domaines C-terminaux C2, C2A et C2B.

L'analyse par électrophysiologie des neurones d'hippocampe de souris

n'exprimant pas la Synaptotagmine 1 révèle une diminution de la composante synchrone rapide de l'exocytose régulée, mais la réponse asynchrone et l'exocytose spontanée sont préservées [Geppert et al., 1994].

Dans les cellules chromaffines n'exprimant pas la Synaptotagmine 1, l'exocytose rapide des granules est diminuée; cependant, une forme plus lente subsiste [Voets et al., 2001a]. La diminution de la sensibilité au calcium de la Synaptotagmine par la mutation des résidus positifs entourant le site de fixation du calcium du domaine C2A dans les neurones de souris provoque une diminution de la sensibilité au calcium de l'exocytose des neurotransmetteurs, mais n'affecte pas l'exocytose spontanée [Fernández-Chacón et al., 2001]. Ces données confirment un rôle de senseur de calcium pour la Synaptotagmine.

Dans les cellules chromaffines n'exprimant ni la Synaptotagmine 1 ni la Synaptotagmine 7, la réponse rapide de l'exocytose est complètement abolie, révélant que ces deux protéines assurent la totalité de la fonction de senseur de calcium. Cependant, une réponse lente de l'exocytose est toujours détectable [Schonn et al., 2008].

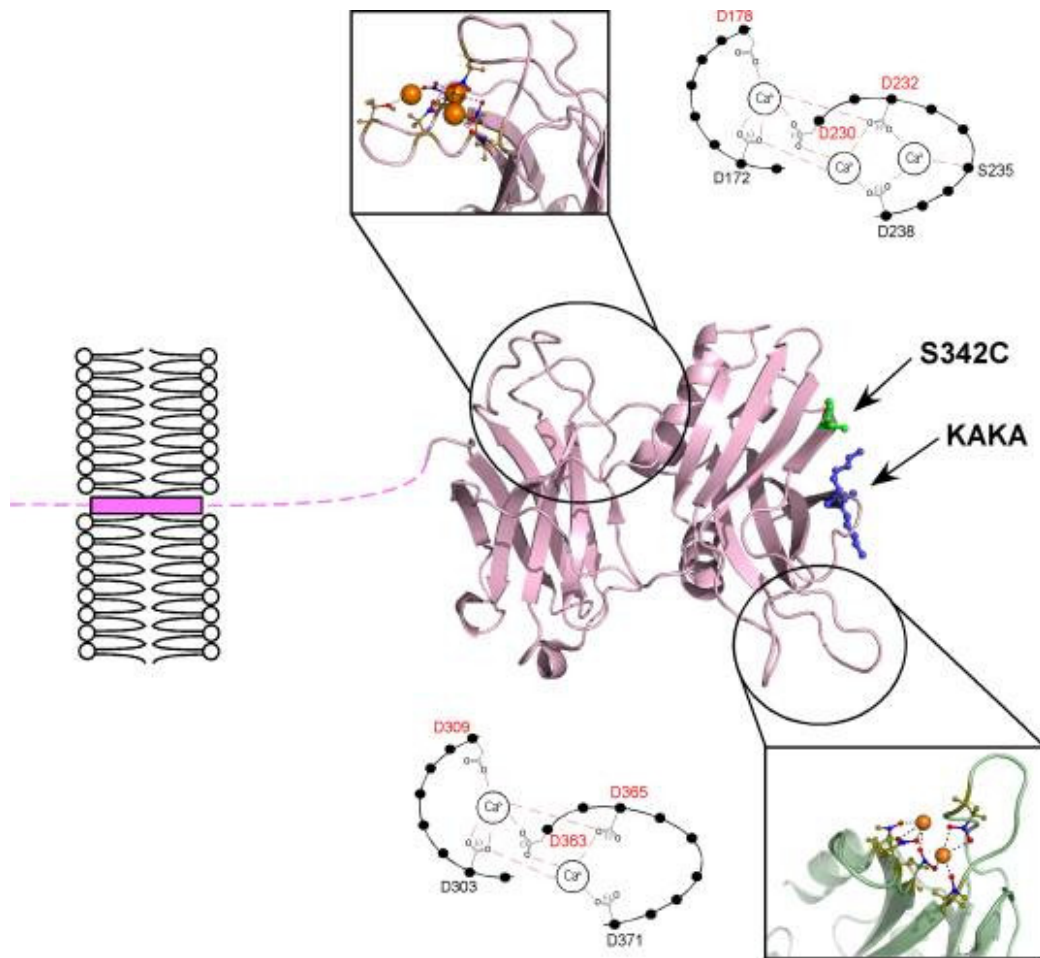


FIGURE 1.11 – La Synaptotagmine et ses domaines de liaison au calcium. Les deux régions entourées sont les régions C2 qui chélatent le calcium. La région C2A (en haut) chélate 3 ions calcium, tandis que la région C2B (en bas) en chélate 2. (Source : [Radhakrishnan et al., 2009])

La Synaptotagmine peut se lier au complexe SNARE et déplacer la complexine lors de l'augmentation de la concentration en calcium, permettant au complexe SNARE de finir de se « zipper » [Tang et al., 2006]. Mais ce n'est pas le seul rôle de la Synaptotagmine, en effet les deux domaines C2 peuvent également se lier à des lipides.

- C2A se lie à des lipides chargés négativement.
- C2B se lie à PIP_3 en l'absence de calcium, et à $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ en leur pré-

sence [Radhakrishnan et al., 2009].

Ces domaines peuvent également pénétrer partiellement les membranes suite à la liaison au calcium. Il existe deux modèles (voir FIGURE 1.7.2 page suivante) pour l'action de la Synaptotagmine (voir la revue [Sørensen, 2009]).

- *Modèle levier* : La liaison au complexe SNARE ajoutée à la liaison calcium-dépendante à la membrane pourrait provoquer un mouvement de bascule du complexe SNARE alors qu'il est rapproché de la membrane. Cette bascule serait associée au départ de la complexine permettant la formation complète du complexe SNARE. Si la séquence liante entre l'ancre membranaire de la Syntaxine et son domaine SNARE est relativement rigide, cela provoquerait une déformation de la membrane plasmique, rapprochant les membranes [Dai et al., 2007]. Ce modèle est soutenu par le fait que la Synaptotagmine a tendance à courber la membrane plasmique [Martens et al., 2007]; et qu'elle pourrait se lier au centre du complexe SNARE [Rickman et al., 2006]; de plus, la séquence de liaison de la Syntaxine 1 est assez rigide [Knecht and Grubmüller, 2003].
 - *Modèle cale* : La Synaptotagmine peut agréger les membranes *in vitro*, en particulier le domaine C2B [Araç et al., 2006]. Un mutant de la Synaptotagmine incapable d'agréger les membranes augmente la vitesse de fusion des vésicules due aux SNAREs et ne restaure pas le phénotype des neurones d'hippocampe [Xue et al., 2008]. Ces données suggèrent que la Synaptotagmine s'insère dans la membrane près de la zone C-terminale de la Syntaxine, et forme une cale chargée positivement autour de laquelle les membranes peuvent s'associer.
-

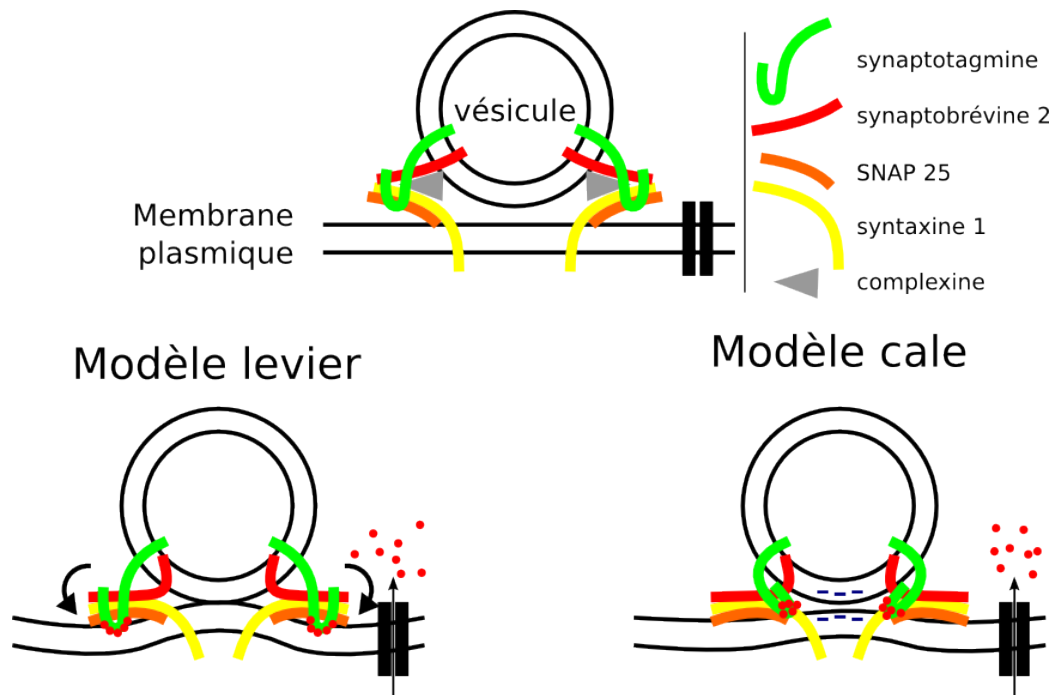


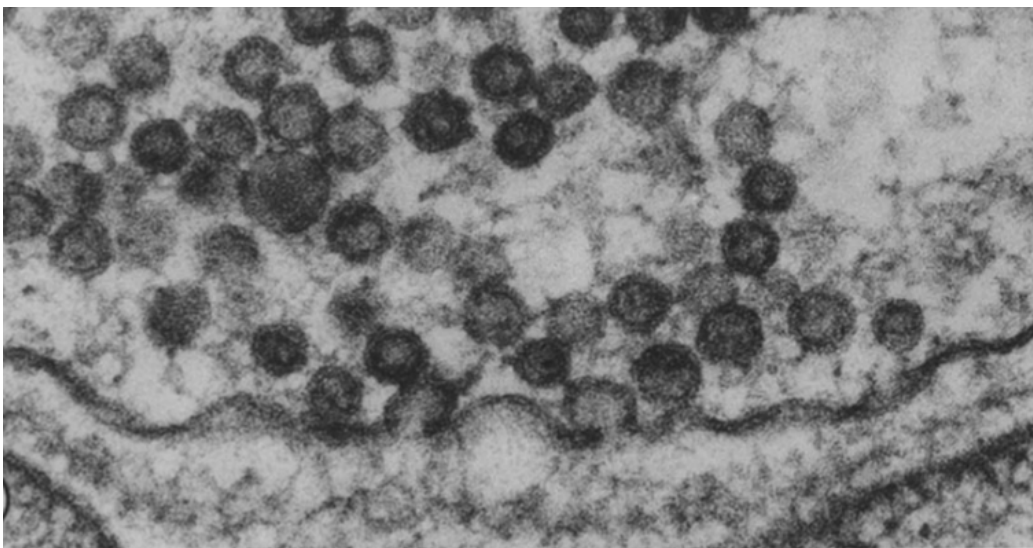
FIGURE 1.12 – Au repos, le complexe SNARE est faiblement associé et la complexine empêche l’association totale du complexe SNARE. Lors d’un influx de calcium (cercles rouges), la Synaptotagmine déplace la complexine et permet au complexe SNARE de se « zipper » complètement. Dans le modèle de levier (à gauche), la Synaptotagmine s’ancre dans la membrane plasmique, et fait un effet de levier sur le complexe SNARE provoquant une courbure de la membrane plasmique et rapprochant les deux membranes. Dans le modèle de cale (à droite), la Synaptotagmine se lie dans la région C-terminale du complexe SNARE, rapprochant les ions calcium associés aux domaines C2 des membranes chargées négativement, facilitant leur rapprochement.

La Synaptotagmine joue donc probablement un rôle à la fois dans l’amorçage de la fusion, mais aussi dans le déclenchement calcicum-dépendant de la fusion des membranes.

1.7.3 Formation du pore

La fusion des membranes provoquée par l’influx de calcium mène à la formation d’un pore de fusion (voir la revue [Jackson and Chapman, 2008]). Le pore de fusion a été observé par microscopie électronique. Sur ces images,

(voir FIGURE 1.7.3) on voit un pore de fusion d'environ $\sim 50\text{nm}$ de diamètre [Heuser and Reese, 1981, Chandler and Heuser, 1980]. Cependant, l'absence d'information dynamique laissait penser que ces pores pouvaient s'être élargi et que le diamètre initial pouvait être inférieur. Des mesures de capacité ont donc été effectuées, donnant une valeur de conductance de structure de fusion précoce de $S \sim 20 - 300\text{pS}$. On peut alors en déduire que le diamètre de ces structures sont de $\sim 1\text{nm}$ [Lindau and Almers, 1995, Klyachko and Jackson, 2002, Breckenridge and Almers, 1987a]. Il est probable que ces structures soient des pores de fusion au moment de leur formation.



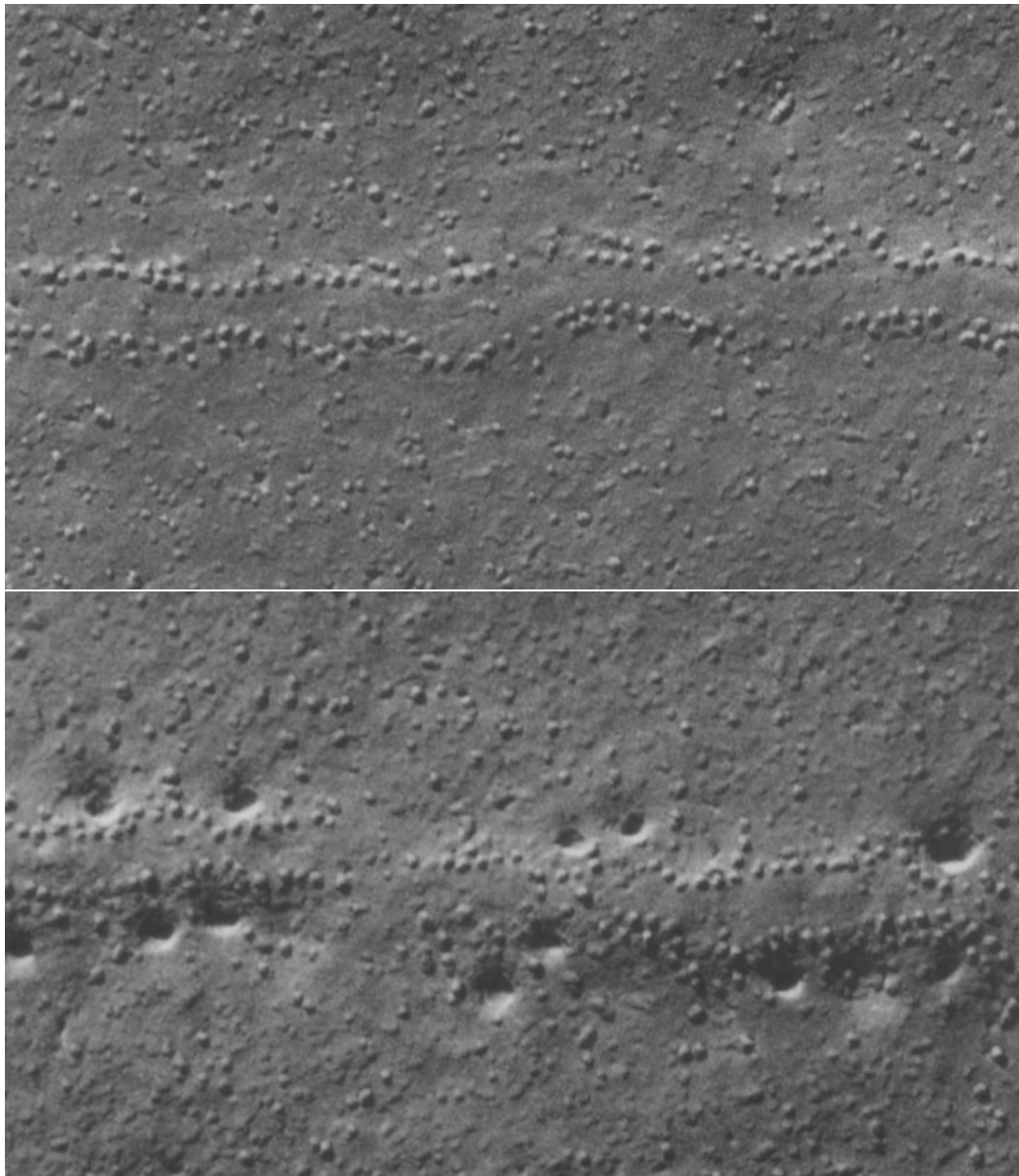


FIGURE 1.13 – **Haut**) Vue transversale de microscopie électronique à transmission de vésicules dans des terminaisons nerveuses à la jonction neuromusculaire de grenouilles stimulées 5ms avant la congélation rapide. Grossis 180 000x. **Milieu - bas**) Vue frontale de la membrane plasmique de terminaison nerveuse en microscopie électronique à fracturation cryogénique. Les neurones sont au repos (milieu) ou ont été stimulés 5ms (bas) avant la congélation rapide. Grossis 120 000x. (Source : [Heuser and Reese, 1981])

Ces structures sont capables de laisser passer des ions, mais également des petits neurotransmetteurs, mis en évidence par des mesures ampérométriques [Jankowski et al., 1993, Chow et al., 1992, Alvarez de Toledo et al., 1993]. Les données concernant sa stabilité sont contradictoires : certaines expériences montrent que le pore de fusion est stable [Zhang and Jackson, 2008, Han and Jackson, 2006], d'autres qu'il est chaotique [Spruce et al., 1990, Zhou et al., 1996, Alés et al., 1999].

On peut alors se demander si ce pore a une structure protéique ou lipidique (voir FIGURE 1.7.3 page suivante). Le pore de fusion initial a une taille compatible avec une structure protéique. Cependant, s'il avait une structure similaire à un canal ionique, sa conduction devrait alors être très stable dans le temps, ce qui n'a pas été établi.

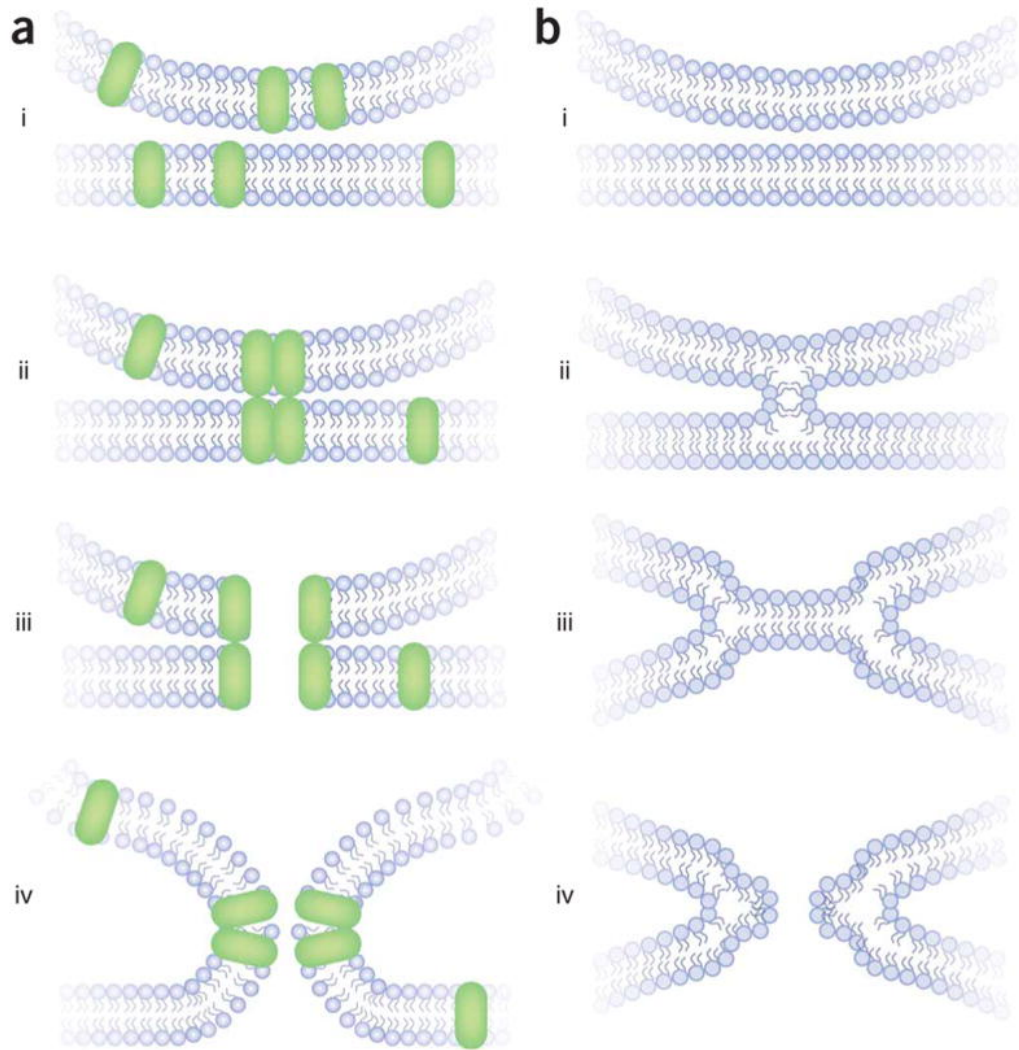


FIGURE 1.14 – **a]** Modèle protéique. **i)** Des protéines capables de former un pore de fusion sont présentes dans la membranes plasmique et la membrane de la vésicule. **ii)** Ces protéines s’associent en un pore fermé. **iii)** Un changement de conformation dans le complexe ouvre le pore de fusion. **iv)** La double couche lipidique fusionne grâce à un remodelage. **b]** Modèle lipidique. **i)** Les bi-couches lipidiques sont rapprochées (par les protéines SNAREs, non représentées). **ii)** Il y a formation d’une première étape d’hémifusion, avec la formation d’une structure en pédoncule. **iii)** Les couches extérieures s’écartent alors que les couches intérieures forment une bi-couche dans un diaphragme d’hémifusion. **iv)** Un pore se forme dans la bi-couche nouvellement formée par les couches intérieures. N.B. : les termes de couches intérieures ou extérieures viennent de l’étude de la fusion de deux vésicules entre elles. Les deux couches qui entrent en contact en premier sont donc les couches extérieures, tandis que la couche en contact avec le milieu extérieur et celle en contact avec la lumière de la vésicules sont les couches intérieures. (*Source : [Jackson and Chapman, 2008]*)

Il existe donc deux hypothèses : la première propose un pore de fusion protéique et l’autre un pore de fusion lipidique.

Pore protéique

Ce modèle propose que des protéines se trouvant dans la membrane de la vésicule et dans la membrane plasmique agissent comme deux héli-canaux et s’associent pour former un pore de fusion protéique (voir la revue [Dunant and Israël, 2000] et voir FIGURE 1.7.3 page précédente). Ce modèle a été proposé car le médiatophore, une protéine de la famille des protéolipides qui inclut la sous-unité c de la portion membranaire de la v-ATPase est un bon candidat pour la libération de l’acétylcholine dans la jonction neuromusculaire du poisson Torpille. Ce protéolipide peut être trouvé dans les liposomes enrichis en acétylcholine, il a une structure pentamérique et un trou central [Dunant and Israël, 2000], et s’accumule dans les terminaisons présynaptiques [Brochier et al., 1993]. Certaines données renforcent cette hypothèse : lors de la fusion de vacuoles de levures, après l’arrimage des vésicules et la formation du complexe SNARE, il y a association de deux unités V_0 de la v-ATPase. Chaque unité provient d’une vésicule différente.

De plus, la reconstitution de la v-ATPase dans les liposomes peut provoquer un flux d'acétylcholine. Les SNAREs assureraient alors seulement l'arrimage des vésicules et la mise au contact des deux unités V_0 . La dilatation du pore de fusion aurait alors lieu par la dissociation progressive des sous-unités des deux unités V_0 .

Cette unité V_0 est également impliquée :

- dans la sécrétion d'insuline dans les cellules β du pancréas, où l'absence de son expression diminue l'exocytose [Peters et al., 2001];
- dans les neurones de la drosophile, où la perte de la sous-unité a1 diminue fortement la transmission synaptique [Sun-Wada et al., 2006];
- dans les neurones du poisson Torpille, où la sous-unité a1 de la v-ATPase se trouve dans la membrane des vésicules et dans la membrane plasmique présynaptique, et interagit avec la Synaptobrévine 2 [Morel et al., 2003];
- dans les neurones de rat, où l'injection d'un fragment de la Synaptobrévine 2 correspondant au domaine de liaison avec l'unité V_0 diminue la neuro-transmission cholinergique et glutamatergique [Di Giovanni et al., 2010].

Cependant, dans ces expériences, il est difficile de distinguer l'effet sur la translocation des protons par la v-ATPase (essentielle à la maturation, voir section 1.4.2 page 11) et la fonction éventuelle de la v-ATPase dans la formation du pore de fusion. Il a été récemment montré qu'un mutant de la v-ATPase conservant l'activité de translocation des protons perturbe la fusion des vacuoles chez la levure [Strasser et al., 2011]. On peut également se demander à quel point le fragment de la Synaptobrévine 2 injecté par *Di Giovanni et al.* est spécifique à la v-ATPase et dans quel mesure il n'aurait pas d'autres effets en interagissant avec le complexe SNARE. La possibilité de l'implication de la v-ATPase dans la formation du pore de fusion est loin d'être établie mais ne peut cependant pas être éliminée.

Une autre possibilité pourrait être la formation d'un pore de fusion protéique constitué des domaines trans-membranaires de la Syntaxine 1 (voir section 1.7.1 page 38 et FIGURE 1.7.3 page ci-contre) [Taraska and Almers, 2004].

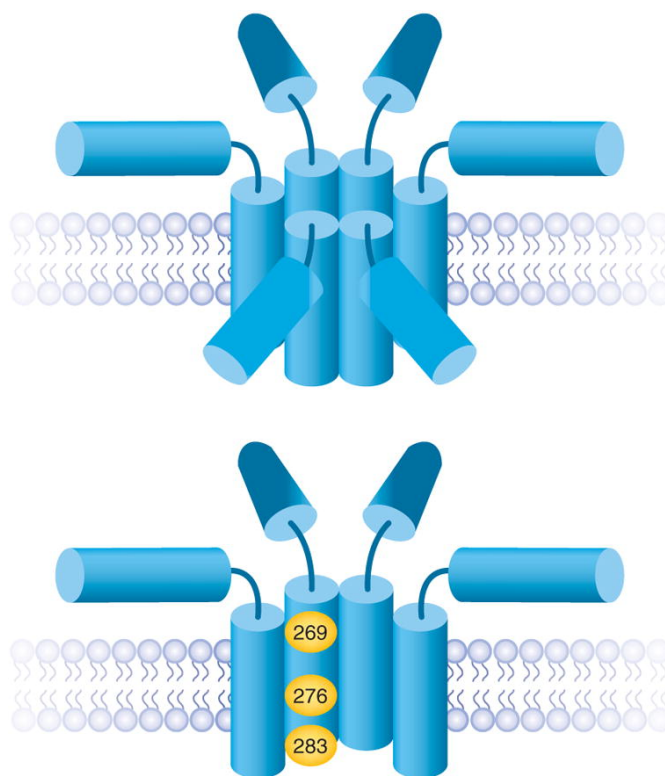


FIGURE 1.15 – Entre 5 et 8 domaines trans-membranaires de la Syntaxine pourraient former un pore de conductance cohérente avec celles mesurées expérimentalement (6 sont montrés ici). Ces domaines sont reliés à leurs domaines SNARE par une séquence de liaison. Ni le pore de fusion de la vésicule, ni les t-SNAREs ne sont représentés ici. Les résidus dont la mutation affecte la conductance du pore de fusion sont tous sur la même face de l'hélice qui constitue le domaine trans-membranaire [Taraska and Almers, 2004]. Ces résidus sont indiqués en jaune. (Source : [Jackson and Chapman, 2008])

Que ce soit la v-ATPase ou les Syntaxines qui forment le pore, cette hypothèse ne permet pas d'expliquer facilement l'expansion du pore de fusion. En effet, la sous-unité V_0 est très stable, et devrait être désassemblée pour permettre l'expansion du pore de fusion, ce qui est coûteux en énergie. De plus, cette hypothèse implique que la partie hydrophobe de la bi-couche lipidique est exposée au milieu aqueux, ce qui est également défavorable.

Pore lipidique

L'hypothèse d'un pore lipidique est la plus communément admise. Dans ce modèle, les membranes de la vésicule et de la cellule sont rapprochées. Ce processus nécessite de franchir une importante barrière énergétique car il faut vaincre la répulsion électrostatique des têtes hydrophiles chargées négativement des deux membranes, déshydrater les membranes, et vaincre la force de Helfrich (due à l'ondulation des membranes). Les protéines SNAREs pourraient assurer ce rôle, car la fermeture complète du complexe SNARE est thermodynamiquement favorable. Il y a alors hémifusion des couches extérieures des bi-couches lipidiques, et le contenu lipidique peut se mélanger. La zone de contact entre les deux couches extérieures s'agrandit pour former un pédoncule. Les couches intérieures s'écartent et tirent sur le pédoncule, et pourraient créer une perturbation suffisante pour former un pore de fusion [Kozlov et al., 1989]. C'est seulement à ce moment là que les contenus aqueux sont mis en contact.

De nombreuses données confirment cette hypothèse : des membranes artificielles peuvent fusionner en l'absence de protéines, et suivent la séquence de la section (b) de la FIGURE 1.7.3 page 54 [Chanturiya et al., 1997, Lee and Lentz, 1997]. Lorsque l'eau est retirée, les membranes peuvent former des structures en pédoncule [Yang and Huang, 2002]. Des liposomes intégrant des protéines SNAREs recombinantes peuvent fusionner [Weber et al., 1998]. Le contenu lipidique se mélange avant le contenu aqueux confirmant le modèle en pédoncule [Abdulreda et al., 2008, Liu et al., 2008, Xu et al., 2005, Yoon et al., 2006]. De même avec des vacuoles de levure isolées [Jun and Wickner, 2007, Reese et al., 2005, Reese and Mayer, 2005]. Cependant, aucune de ces expériences ne permet d'affirmer qu'il y a effectivement hémifusion, puisque les monocouches ne sont pas directement observées. Il a été montré dans certains systèmes l'existence d'un intermédiaire d'hémifusion : dans les synapses corticales observées par tomographie électronique, trois quart des vésicules arrimées à la membrane montrent une structure d'hémifusion, [Zampighi et al., 2006]; la mutation du domaine trans-membranaire des protéines SNAREs de la levure mène à la formation d'un intermédiaire

d'hémi-fusion stable [Xu et al., 2005]; dans les oeufs d'oursin, des expériences de récupération de la fluorescence après photo-blanchiment montrent que les granules sont maintenus dans un état d'hémi-fusion [Wong et al., 2007]. Cependant, il n'est pas établi clairement que le mélange lipidique observé et ces structures soient un intermédiaire menant à la fusion ou un mécanisme différent [Giraud et al., 2005, Wong et al., 2007].

La formation du pédoncule implique une forte courbure négative de la membrane plasmique, ce qui pourrait être favorisé par la synthèse locale de lipides coniques grâce au recrutement de la phospholipase D [Bader et al., 2004, Humeau et al., 2001, Vitale et al., 2001] (voir la revue [Chasserot-Golaz et al., 2010]).

La formation du pore de fusion ne constitue pas la dernière étape de la régulation de l'exocytose. Le pore de fusion peut se refermer ou s'étendre, modulant ainsi le mode de fusion.

Dynamique du pore de fusion

Des mesures de capacité dans différentes cellules montrent que le pore de fusion est dynamique : lors de la fusion, la capacité augmente d'un quantum, et est suivie d'une diminution rapide, révélant que le pore de fusion se referme, et qu'il s'agit donc d'un processus réversible [Alvarez de Toledo et al., 1993, Lollike et al., 1995, Breckenridge and Almers, 1987b]. Dans les neurones d'hypophyse de rat [Klyachko and Jackson, 2002], et dans les neutrophiles humains [Lollike et al., 1998], l'augmentation de la capacité correspond exactement à la diminution, ce qui suggère qu'il n'y a pas d'échange de membrane. En revanche, dans les mastocytes, la diminution de la capacité ne compense pas l'augmentation qui précède, ce qui suggère un échange de membrane et donc un pore lipidique [Monck et al., 1990].

La formation du pore de fusion est un processus réversible. La dilatation du pore mène à une fusion complète impliquant l'aplatissement de la vésicule et la libération complète du contenu de la vésicule. La refermeture du pore mène à la fusion partielle et la libération partielle du contenu (voir FIGURE 1.7.3 page suivante).

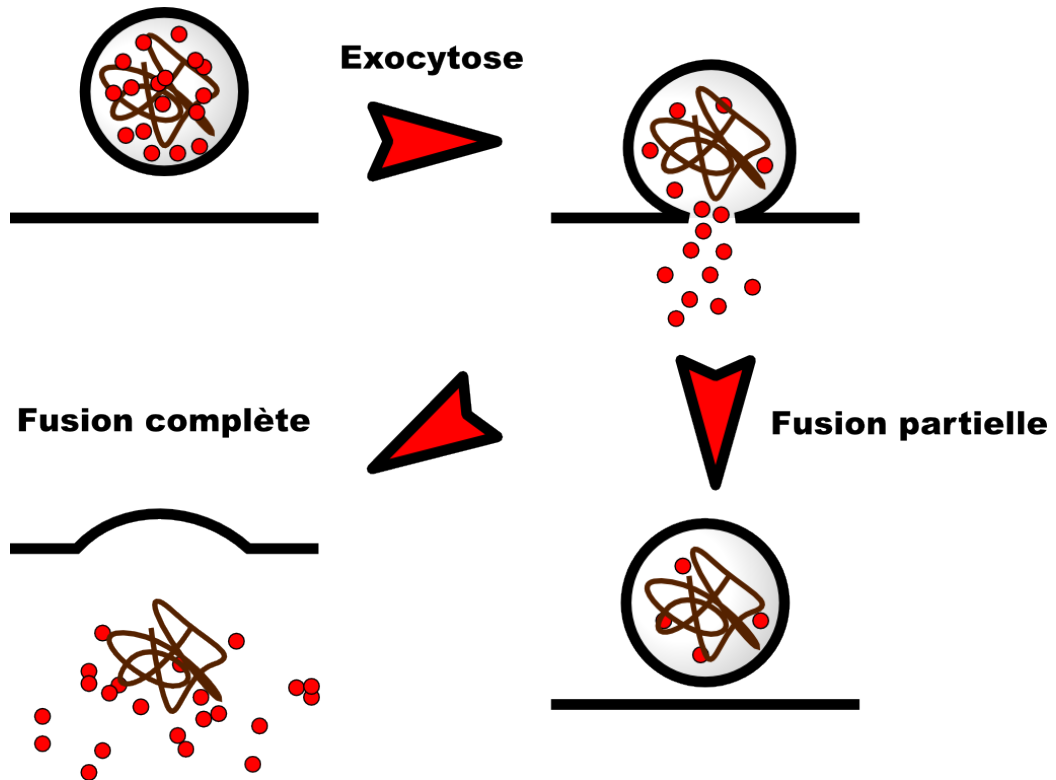


FIGURE 1.16 – Une fois le pore de fusion formé, le pore peut se dilater ou se refermer, menant à un évènement de fusion complète avec libération du contenu de la vésicule ou le pore peut se refermer, menant à un évènement de fusion partielle avec rétention du contenu.

La forte courbure provoquée par la fusion des membranes est une forme haute en énergie, et donc peu stable. Ceci peut mener à la refermeture du pore de fusion [Jorgacevski et al., 2010, Perutková et al., 2010]. Il a été montrée récemment que la stabilité du pore de fusion augmente avec la taille de la vésicule. Or, la courbure de la membrane plasmique au niveau du pore de fusion dépend de la taille de la vésicule.

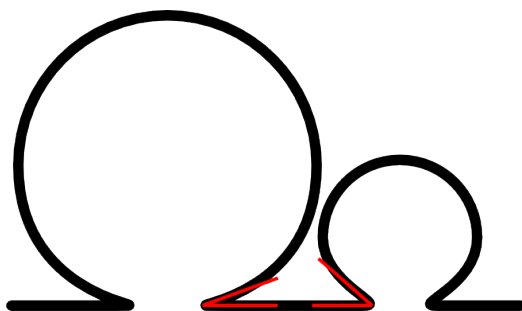


FIGURE 1.17 – Deux vésicules de sécrétion de taille différente fusionnées à la membrane plasmique (ligne noire). La courbure de la membrane est supérieure pour la vésicule la plus grosse (voir les angles en rouge).

Ceci suggère que plus la courbure est importante, plus il est difficile de dilater le pore de fusion [Zhang and Jackson, 2010, Jorgacevski et al., 2010]. Cette étape pourrait donc constituer une forte barrière énergétique.

1.7.4 Mode de fusion : complète ou partielle ?

La libération du contenu des granules de fusion dépend du temps de vie du pore de fusion et de son expansion (voir FIGURE 1.7.3 page précédente et section 3.1.3 page 155).

L'existence de deux modes de fusion dans l'exocytose a été montrée d'une part dans les neurones du muscle couturier de la grenouille par Heuser et Reese. La stimulation à 10Hz de ces neurones entraîne la diminution du nombre de vésicules et une augmentation de la surface de la membrane plasmique, suggérant une fusion complète des vésicules avec la membrane plasmique [Heuser and Reese, 1973]. Parallèlement, Ceccarelli et al. ont confirmé ce mode d'exocytose et ont également proposé l'existence d'une fusion transitoire qui sera nommé plus tard « baiser volé ». La stimulation de jonction neuro-musculaire de la grenouille à 2Hz montre que la surface de la membrane plasmique ne s'étend pas, mais que les vésicules entrent en contact avec la membrane au travers d'un pore [Ceccarelli et al., 1973].

La question de la coexistence des deux modes de fusion et de leur rôle physiologique a été clairement montré dans les cellules chromaffines, mais reste débattue dans les neurones.

La fusion complète a été largement caractérisée par électrophysiologie et microscopie électronique [Elhamdani et al., 2006, Patzak and Winkler, 1986]. Dans ce type d'évènement, le pore de fusion se dilate complètement, donnant lieu à un mélange total de la membrane de la vésicule et de la membrane plasmique [Harata et al., 2006, Rizzoli and Jahn, 2007]. Ce mode de fusion donne lieu à la libération totale du contenu de la vésicule.

Un autre mode de fusion apparenté au « Kiss & Run » a été nommé cavapture. Ce mode de fusion a été décrit abondamment dans les cellules chromaffines par électrophysiologie et vidéo-microscopie [Alés et al., 1999, Artalejo et al., 1995, Elhamdani et al., 2006, Perrais et al., 2004, Taraska and Almers, 2004]. Au cours de ce type d'évènement, les granules vont fusionner avec la membrane, et maintenir une forme d'oméga (Ω). Cette structure pourrait permettre que le granule soit facilement récupéré et recyclé rapidement. Contrairement à la fusion complète, seule une fraction du contenu du granule est libéré : des catécholamines et autres petites molécules pourraient diffuser au travers d'un pore de fusion contraint, alors que des protéines plus grosses comme le neuropeptide-Y ou la chromogranine resteraient séquestrées dans le granule [Fulop et al., 2005].

Le terme de « Kiss & Run » désigne habituellement les évènements impliquant une refermeture du pore de fusion détectable. La cavapture désigne tous les évènements de fusion partielle au cours desquels le granule maintient sa forme (Ω) [Perrais et al., 2004].

Dans les cellules chromaffines, le mode de fusion dépend de l'intensité de la stimulation. Lorsque la stimulation est faible, la plupart des évènements sont des évènements de fusion partielle. On parle de mode « reproduction et alimentation » (*breed and feed* en anglais). Lorsque la stimulation est intense, le mode de fusion complète est privilégié ; on parle alors de mode « combat ou fuite » (*fight or flight* en anglais). Voir plus de détails dans la section 1.7.3 page 59.

Kiss & Run dans les neurones : le débat

Bien que notre travail ne porte pas sur les neurones, le débat du « Kiss & Run » dans les neurones est une question très débattue et incontournable. La difficulté de ce type d'étude vient du fait que la taille des vésicules synaptiques ($\sim 40\text{--}50\text{nm}$) accumulée dans un bouton synaptique ($\sim 300\text{nm}$ de diamètre) rend impossible la résolution de vésicules synaptiques individuelles (limite de la résolution optique $\sim 200\text{nm}$). Des techniques récentes de microscopie (Palm, Sted, Storm...) permettent de franchir la limite de la résolution optique, mais ne permettent pas de travailler sur des échantillons vivants ou n'offrent pas de résolution temporelle suffisante pour étudier des phénomènes aussi rapides ($< 100\text{ms}$).

Des événements de « Kiss & Run » ont été détectés dans la synapse géante du calice de Held [He et al., 2006], avec des augmentation de capacité suivie après un délai variable d'un retour à la ligne de base.

Une méthode pour détecter les événements de « Kiss & Run » a été développée par Balaji et Ryan : l'utilisation de protéines vésiculaires fusionnées avec la pHluorine [Balaji and Ryan, 2007]. La pHluorine est un mutant de la protéine fluorescente verte (GFP pour Green Fluorescent Protein). La pHluorine est en équilibre acido-basique entre une forme acide qui ne fluoresce pas et une forme basique fluorescente. L'émission de la pHluorine est donc éteinte à pH acide et émet aux pH neutre et basique. Différentes formes de pHluorine ont été développées (voir FIGURE 1.7.4 page suivante).

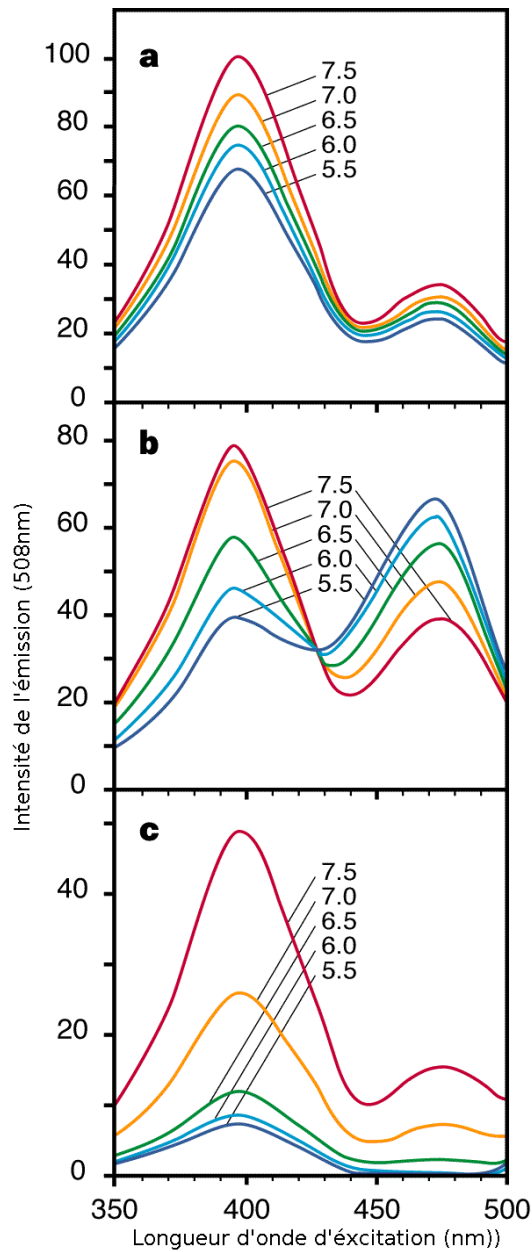


FIGURE 1.18 – a) Spectre la GFP en fonction du pH. b) Spectre de la pHluorine ratiométrique. c) Spectre de la pHluorine écliptique. Les spectres des mutants de la GFP montrent une sensibilité aux variations de pH bien supérieures à la GFP. (Source : [Miesenböck *et al.*, 1998])

Balaji et *Ryan* ont utilisé le transporteur vésiculaire de glutamate (v-

Glut) fusionné à la pHluorine dans des terminaisons nerveuses. La pHluorine, présente dans la lumière acide des vésicules synaptiques est éteinte. Lors de la fusion, le v-Glut est mis en contact avec le milieu extérieur de pH neutre, et la pHluorine est alors déprotonée et fluoresce. Le v-Glut peut ensuite être endocyté dans des vésicules qui vont s'acidifier, provoquant la disparition du signal de la pHluorine. Les auteurs ont étudié la réponse du signal de la pHluorine à une stimulation d'un potentiel d'action unique. L'augmentation du signal de la pHluorine est suivie d'une diminution. Cette diminution peut-être ajustée avec une unique exponentielle ayant pour temps caractéristique 14 secondes. Cette diminution est interprétée par les auteurs comme l'endocytose. Le fait que la diminution suit une exponentielle unique suggère qu'il n'existe qu'un seul mode d'endocytose, et que l'exocytose passe donc principalement par un mode de fusion complète [Balaji and Ryan, 2007]. De plus, dans les neurones d'hippocampe, les vésicules synaptiques ont été marquées à l'aide de FM1-43, un marqueur fluorescent qui s'associe aux membranes biologiques. Le quantum de fluorescence libéré dans la membrane de la synapse lors d'un événement d'exocytose est équivalent à celui contenu dans une vésicule synaptique, montrant un mode de fusion « tout ou rien », suggérant que le seul mode de fusion est le mode de fusion complète [Chen et al., 2008].

On peut cependant se demander si l'utilisation de marqueurs membranaires est le plus judicieux pour discriminer les événements de fusion complète et de « Kiss & Run », puisque dans les deux cas, les membranes fusionnent, et le contenu des membranes pourrait diffuser, sans pour autant perdre la structure en Ω de la vésicule. *Chen et al.* ont vérifié que le FM1-43 ne diffusait pas dans l'axone suite à la fusion, mais la membrane de la synapse et celle de l'axone sont peut-être séparées par une barrière diffusive qui permettrait de maintenir des contenus différents dans les deux régions.

D'autres études suggèrent que le mode principale de fusion est celui de « Kiss & Run ». L'observation dans les neurones d'hippocampe de la libération du FM1-43 marquant les vésicules synaptiques suite à un potentiel d'action unique révèle que la diminution du signal de FM1-43 est progressive et lente, suggérant l'existence de plusieurs événements de fusion partielle suc-

cessifs libérant seulement une fraction du FM1-43 à chaque fois. De plus, la diminution du signal est discrète. L'analyse des quantités de FM1-43 libérées révèle l'existence de deux populations représentant de petites et de grandes quantités libérées. L'analyse cinétique de ces événements montre que ceux qui libèrent de grandes quantités sont rapides et sont interprétés comme des événements de fusion complète, alors que les libérations plus petites sont de taille plus variables et plus lents, et sont interprétés comme des événements de fusion partielle, *i.e.* des « baisers volés » [a.M. Aravanis et al., 2003].

Une autre approche a été utilisée par *Zhang et al.*. Le groupe a marqué les vésicules synaptiques à l'aide de boîtes quantiques (Qdot, *quantum dots* en anglais). Les Qdots sont de petits cristaux semi-conducteurs fluorescents. Ils montrent une remarquable photo-stabilité et une forte absorbance, et sont donc très lumineux malgré leurs faibles rendements quantiques. Ils permettent donc le suivi de Qdots uniques facilement. Une forme sensible au pH des Qdots permet de détecter les événements de fusion partielle et complète. Lors d'un événement de fusion partielle, le signal du Qdot augmente du fait de la neutralisation du pH ; lors d'un événement de fusion complète, on observe la même augmentation mais le signal est rapidement perdu à cause de la diffusion du Qdot. *Zhang et al.* montrent que le mode de fusion en « Kiss & Run » prédomine pour le groupe de vésicules rapidement libérables. Lors de la stimulation à 0,1Hz, le mode de fusion principal est la fusion complète, alors que lors de stimulations plus intenses, le mode de fusion prédominant devient le mode en « Kiss & Run ». Ainsi, chaque mode correspondrait à différentes conditions physiologiques [Zhang et al., 2009].

L'inconvénient de l'utilisation de Qdots est qu'ils sont très volumineux : environ 15nm de diamètre pour un diamètre de la lumière d'une vésicule d'environ 25nm. De plus, ils semblent avoir une forme d'interaction avec la membrane plasmique puisqu'ils sont endocytés, favorisant ainsi la formation de vésicules autour d'eux. On peut alors imaginer que les Qdots favorisent un maintien de la forme de la vésicule au moment de l'exocytose.

La question du mode de fusion dans les neurones n'est pas résolue, et se trouve à la limite de nos moyens techniques actuels.

Régulation de l'expansion du pore de fusion

Le pore de fusion peut être régulé par de nombreux facteurs différents : la Synaptotagmine, la Myosine II et ses régulateurs (*e.g.* protéine kinase C), la dynamine, le cortex d'actine. Voir plus de détails dans la section 3.1.3 page 155.

1.8 Recyclage des vésicules de sécrétion

Quel que soit le mode de fusion, complète ou partielle, il est nécessaire de recycler les granules de sécrétion : la fusion mène à un changement de conformation du complexe SNARE vers sa forme *cis*, et une partie ou la totalité du contenu du granule de sécrétion est libéré. Il est nécessaire de recycler le complexe SNARE, et de compenser l'apport de membrane par une endocytose compensatoire.

1.8.1 Recyclage du complexe SNARE

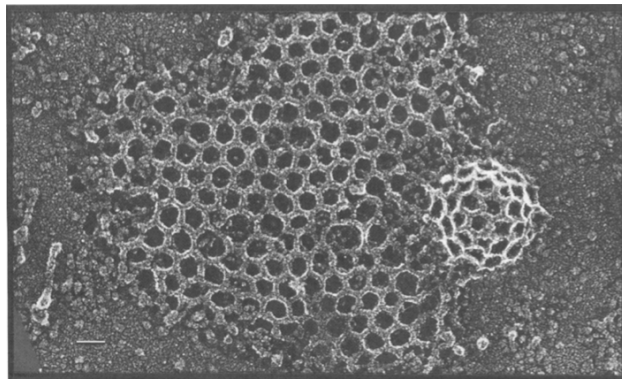
La fusion mène à la formation du complexe *cis*-SNARE qui est très stable. Le complexe SNARE est recyclé par l'ATPase NSF à l'aide de son co-facteur α -SNAP [Söllner et al., 1993a]. α -SNAP se lie au complexe *cis*-SNARE, et permet le recrutement de NSF et favorise son activité d'hydrolyse de l'ATP [Malsam et al., 2008]. L'hydrolyse de l'ATP provoque un changement de conformation qui permet de désassembler le complexe SNARE qui pourra alors être réutilisé.

1.8.2 Endocytose clathrine-dépendante à la suite d'évènements de fusion complète

Après un évènement de fusion complète, le granule perd son identité : son contenu est libéré dans le milieu extérieur, sa forme s'aplati, son contenu membranaire diffuse dans la membrane plasmique. Cette endocytose décrite comme « compensatoire » car elle permet d'éliminer le surplus de membrane

apporté par l'exocytose. Ce processus lent met en oeuvre une machinerie complexe impliquant les clathrines [Artalejo et al., 2002, Elhamdani et al., 2006]. Celles-ci s'accumulent au niveau de micro-domaines lipidiques, recrutées par la protéine adaptatrice 2 (AP2). La formation d'un réseau de clathrines provoque l'invagination de la membrane plasmique, formant une vésicule d'endocytose. La dynamine 2 est alors recrutée au cou de la vésicule et déclenche la constriction du cou, et la fission de la vésicule et de la membrane plasmique. Le réseau de clathrines sera alors désassemblé à l'aide de la Hsc70 (ATPase), de la synaptojanine 80 (phosphatase de lipides) et de l'auxiline.

La vésicule ainsi endocytée sera alors réintégrée au trafic intracellulaire et les composants seront réutilisés.



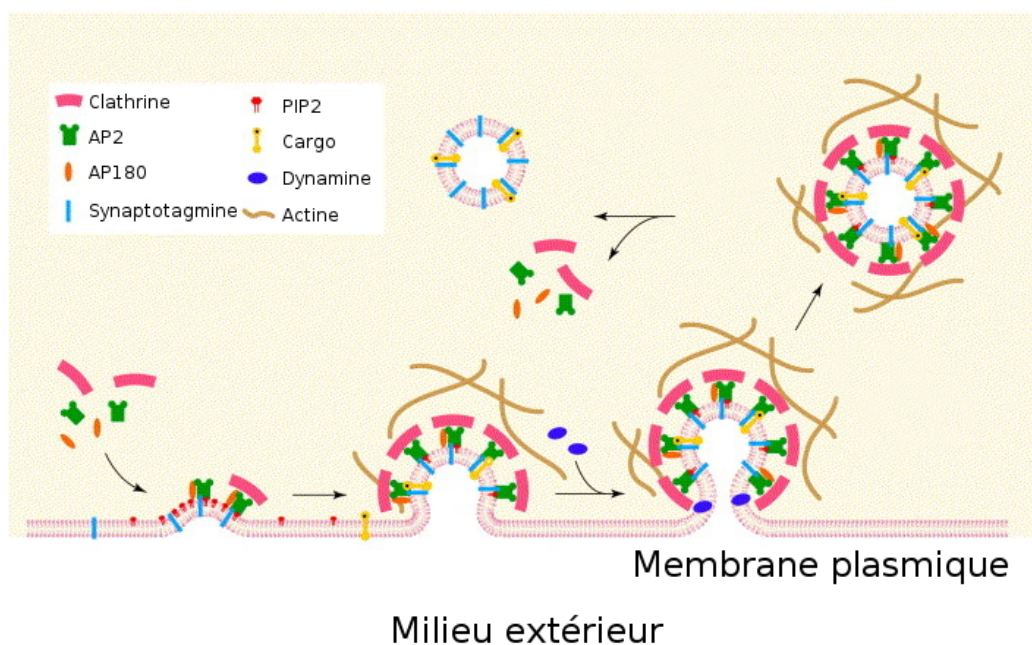


FIGURE 1.19 – **Haut**) Microscopie électronique d'un réseau de clathrines dans les carcinomes humains. Échelle : 33nm. (Source : [Heuser and Reese, 1973]). **Bas**) Modèle de l'endocytose dépendante de clathrine. On peut voir le recrutement des clathrines à la membrane plasmique par AP2, et la formation d'une invagination. L'invagination va être séparée de la membrane plasmique par le recrutement de la dynamine. La vésicule ainsi formée sera déshabillée de son réseau de clathrines par HSC70, la synaptojanine 80 et l'auxiline. (Source : [Takei and Haucke, 2001])

1.8.3 Recyclage des vésicules après fusion partielle

Lors d'un « Kiss & Run » cavicapture, la vésicule de sécrétion conserve son identité : sa forme en Ω , une fraction de son contenu, une fraction du contenu de sa membrane. Ce processus est rapide et n'implique pas les clathrines, mais implique la dynamine 1 [Artalejo et al., 1995, Elhamdani et al., 2006]. À l'instar de l'endocytose médiée par les clathrines, la dynamine pourrait s'accumuler au cou de la vésicule et promouvoir la fermeture du pore de fusion et le détachement de la membrane.

De nombreuses études montrent cette conservation d'identité après fusion

[Obermüller et al., 2005, Perrais et al., 2004, Tsuboi and Rutter, 2003], cependant il n'a jamais été montré qu'une vésicule individuelle pouvait fusionner plusieurs fois de suite.

1.9 Méthodes d'étude et d'analyse de l'exocytose

De nombreuses méthodes permettent l'étude de l'exocytose. Elles apportent toutes des informations différentes sur l'exocytose. Nous allons en voir quelques unes ici, permettant d'analyser au moins l'une des étapes de l'exocytose : le transport, l'arrimage à la membrane ou la fusion.

Pour une revue des méthodes d'analyse des évènements uniques d'exocytose [Omiatek et al., 2010].

1.9.1 Sur population : immuno-détection, radiodétection, ELISA

Plusieurs techniques permettent la mesure sur population de l'exocytose. Ces techniques reposent principalement sur la mesure d'un produit libéré lors de l'exocytose. Les techniques de détection reposent principalement sur l'immuno-détection, la radiodétection, ou les tests ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) [Kurien and Scofield, 2006, Popii and Baumann, 2004].

Typiquement, les cellules sont traitées puis déposées dans des puits contenant $10^5 - 10^7$ cellules. Elles peuvent alors être chargées à l'aide d'une molécule rapporteuse qui sera spécifiquement chargée dans les vésicules de sécrétion, en particulier dans le cas de la radiodétection. Les cellules sont ensuite lavées pour éliminer toute trace de la molécule rapporteuse liée non spécifiquement au substrat ou à la membrane plasmique. Les cellules sont ensuite stimulées par un sécrétagogue. Il existe différentes méthodes :

- Digitonine : ce détergent perce des trous dans la membrane plasmique provoquant l'entrée du calcium. Cette méthode est efficace mais reste peu rigoureuse puisqu'on déstabilise la membrane plasmique qui sera

très impliquée dans le phénomène qu'on souhaite observer.

- K^+ concentré : l'utilisation de solution de potassium concentré provoque la dépolymérisation de la membrane plasmique et l'ouverture de canaux calciques dépendants du voltage, ce qui déclenche l'exocytose.
- Ba^{2+} : le barium provoque la libération de calcium depuis des réservoirs internes de la cellule et bloque l'efflux de calcium au travers de la membrane plasmique augmentant la concentration du calcium cytosolique [Przywara et al., 1993].
- Ionomycine : ce ionophore produit par la bactérie *Streptomyces conglobatus* transporte le calcium au travers des membranes plasmiques.

Le milieu extra-cellulaire est ensuite récupéré et analysé suivant la méthode choisie.

L'immuno-détection est la technique la plus solide, puisque la reconnaissance par un anticorps ainsi que l'analyse du poids moléculaire permet d'identifier la molécule sécrétée avec certitude. Cependant, cette technique est moins sensible que les deux autres, et se prête mal à la quantification.

L'utilisation de la spectroscopie de masse permet également d'analyser le milieu extérieur et d'identifier les protéines endogènes [Nguyen et al., 1995].

Ces techniques permettent d'avoir des renseignements à l'échelle de la population, et permettent de dégager facilement un comportement moyen. En revanche, ils offrent une résolution temporelle très faible, et ne permettent pas de résoudre des événements individuels.

Le développement de la micro-fluidique a récemment permis d'étudier des volumes plus petits [Huang et al., 2011], et l'analyse de cellules uniques dans des volumes de l'ordre du picolitre, à l'aide de micro-immuno-détection.

Ces techniques ne donnent accès qu'aux molécules sécrétées, et ne permettent donc pas d'obtenir d'informations sur les différentes étapes de l'exocytose et leur dynamique. Pour cela, il faut avoir recours à d'autres techniques.

1.9.2 Méthodes électriques

Les méthodes électriques reposent sur la mesure de courants ou de capacité lors de phénomènes biologiques. Ces méthodes reposent sur la détection d'évènements d'exocytose uniques et présentent l'avantage d'avoir des résolutions temporelles très élevées.

Il existe deux méthodes principales : l'ampérométrie qui consiste à la détection de molécules sécrétées par la cellule, et l'électrophysiologie qui consiste à détecter les variations de la surface de la membrane plasmique.

L'ampérométrie à fibre de carbone

N.B. : cette méthode est utilisée au laboratoire et dans cette thèse. Les expériences d'ampérométrie présentées dans le chapitre 2 de cette thèse ont été menées par Dr. Marine Bretou pendant sa thèse. Les expériences d'ampérométrie présentées dans le chapitre 3 de cette thèse ont été réalisées en collaboration avec le Dr. Anne Meunier.

L'ampérométrie à fibre de carbone a été développée dans le laboratoire du Dr. Wightman, et décrit pour la première fois en 1991 [Wightman et al., 1991]. Cette méthode permet la détection d'évènements uniques d'exocytose.

Dans ce type d'expérience, une électrode en fibre de carbone, capable de détecter des courants d'oxydoréduction très faibles de l'ordre de 0,1 pA, est apposée sur la membrane plasmique d'une cellule. Cette cellule est généralement stimulée par perfusion locale d'un sécrétagogue (voir section 1.9.1 page 70 et voir FIGURE 1.9.2 page suivante), provoquant l'augmentation du calcium intracellulaire, déclenchant l'exocytose. Chaque évènement d'exocytose libère son contenu dans le milieu extérieur, au contact de l'électrode. On applique à l'électrode un potentiel (typiquement 750 mV par rapport à l'électrode à chlorure d'argent Ag\AgCl), permettant l'oxydation des molécules oxydables du contenu vésiculaire (catécholamines / mono-amines). Ceci génère un courant d'oxydoréduction sous la forme d'un pic qui est enregistré sur un ampérogramme (voir FIGURE 1.9.2 page ci-contre). Chaque pic correspond à un évènement unique d'exocytose [Wightman et al., 1991, Schroeder et al., 1992].

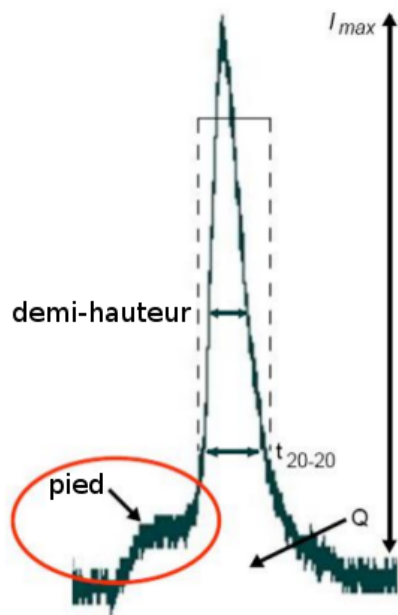
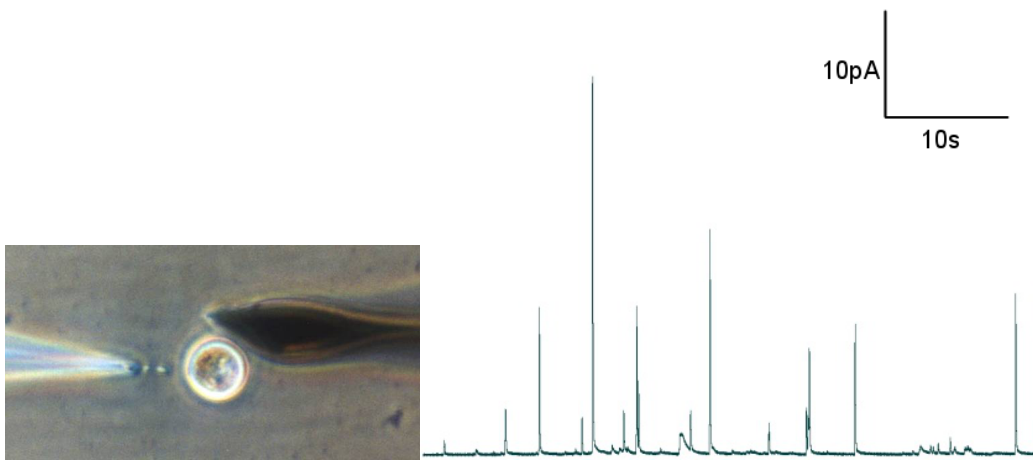


FIGURE 1.20 – **À gauche**, une image d’une cellule analysée par ampérométrie. Au centre, la cellule, stimulée par une perfusion locale à l’aide d’une micro-pipette (à droite). Les évènements d’exocytose sont enregistrés par l’oxydation du contenu des vésicules de sécrétion à la surface de l’électrode (à droite) au contact de la cellule. **À droite**, une trace typique obtenue par ampérométrie. On y distingue plusieurs pics correspondant à des évènements d’exocytose individuels. **En bas**, un pic unique grossi. Le pic est précédé d’un « pied » correspondant à la dilatation du pore de fusion et la diffusion d’une faible quantité de catécholamines au travers de ce pore contraint. Puis l’ouverture du pore de fusion provoque l’augmentation brusque de l’intensité du courant d’oxydoréduction qui forme le pic principal. Les paramètres caractéristiques peuvent être identifiés : la charge Q , l’intensité maximale I_{max} , et le temps de l’évènement t_{20-20} .

Les ampérogrammes donnent de nombreux renseignements, le plus accessible étant la fréquence de l’exocytose qui correspond au nombre de pics par unité de temps. L’analyse de pics individuels permet d’obtenir des informations sur la dynamique de chaque évènement. On peut les décomposer en deux parties : la formation du pore de fusion qui correspond au pied de pré-pic présent chez un à deux tiers des pics et l’expansion du pore de fusion qui donne lieu au pic principal [Albillos et al., 1997, Steyer et al., 1997, Zenisek et al., 2000].

Chaque pic peut être décrit à l’aide de différents paramètres (voir FIGURE 1.9.2 page précédente) : la charge Q , l’intensité maximale I_{max} , et le temps de l’évènement t_{20-20} , et permettent de déterminer la dynamique de chaque évènement d’exocytose.

Cette technique offre une très bonne résolution temporelle, cependant, elle ne donne accès qu’aux évènements ayant lieu au contact de l’électrode, et pour ces évènements, qu’aux étapes tardives de l’exocytose (à partir de la formation du pore de fusion). Des analyses de cinétique permettent d’obtenir des informations sur des évènements en amont, mais ne permettent pas leur observation directe. De plus, les informations données concernent uniquement le contenu libéré par les vésicules ce qui ne donne pas d’information sur la membrane de la vésicule et son contenu.

Électrophysiologie

L'électrophysiologie consiste en une mesure de la capacité de la membrane plasmique.

La membrane plasmique est une bi-couche lipidique imperméable aux ions, bien que des canaux ioniques permettent l'échange actif ou passif d'ions de part et d'autre de la membrane. Cet échange mène à l'établissement d'un potentiel transmembranaire dû à l'accumulation de charges de part et d'autre de la membrane ; négatives côté cytoplasme et positives côté milieu extérieur. Ce système peut donc être assimilé à un condensateur. La capacité d'un condensateur est liée au nombre de charges qu'il peut accumuler. Dans le contexte de la membrane plasmique, ce nombre de charges est lié à la surface de la membrane si la différence de potentiel est constante. La capacité membranaire est donc liée à la surface de la membrane plasmique à voltage constant. Lors d'un événement d'exocytose, cette surface est augmentée, et ceci augmente la capacité [Fernandez et al., 1984]. De même, la capacité diminue lors d'un événement d'endocytose.

À l'aide d'une pipette de « patch-clamp » rescellée avec la membrane plasmique, on peut imposer une différence de potentiel, introduire un sécrétagogue, et mesurer la réponse de la cellule en suivant sa capacité membranaire à l'aide d'un amplificateur de type « lock-in ».

Cette technique a une forte résolution temporelle, et permet de résoudre l'ouverture du pore de fusion. Elle est complémentaire avec l'ampérométrie puisqu'elle donne accès au comportement de la membrane, cependant, elle ne permet pas non plus d'avoir d'information en amont de la formation du pore de fusion.

Récemment, *Rettig et al.* ont développé une méthode pour coupler les mesures de capacité membranaire et l'imagerie à onde évanescente pour permettre d'obtenir des informations sur les événements précédant la fusion [Becherer et al., 2007].

1.9.3 Imagerie

L'imagerie permet d'obtenir des informations sur la localisation et la distribution des granules. L'imagerie moderne se divise en deux catégories :

- la vidéo-microscopie : ces techniques, le plus souvent basées sur l'imagerie à onde évanescente, permettent le suivi des granules dans le temps et donnent des informations dynamiques. Cependant il est impossible d'observer directement les vésicules synaptiques qui sont bien en dessous de la limite de résolution optique.
- la microscopie à haute résolution : que ce soit la microscopie électronique ou les techniques modernes d'imagerie à haute résolution (sted, palm, storm, etc.), ces techniques permettent de résoudre des structures très petites et de voir l'association des vésicules à des protéines par exemple, mais ne permet pas d'obtenir d'information dynamiques précises.

Imagerie à onde évanescente

L'un des enjeux principaux de la microscopie de fluorescence est d'améliorer le rapport signal sur bruit des images. En effet, lorsqu'on observe un échantillon par microscopie à épi-fluorescence, l'ensemble de l'échantillon est excité, alors qu'on observe uniquement le plan focal. La fluorescence provenant des plans distants du plan focal ajoute un bruit de fond aux images qui rend difficile leur traitement (voir [FIGURE 1.9.3](#) page 80).

De nombreuses techniques ont été mises au point pour améliorer le signal sur bruit : la déconvolution qui permet d'améliorer par un traitement mathématique la qualité de l'image à partir d'une pile d'images de plusieurs plans en Z, la microscopie confocale, la microscopie à deux photons, ou l'imagerie à onde évanescente.

Une onde évanescente est une onde électro-magnétique de surface qui est générée par la réflexion totale d'un faisceau lumineux sur une interface entre deux milieux. La première observation d'ondes évanescentes est attribuée à *Newton* (XVIIème siècle). *Newton* défendait la nature corpusculaire de la lumière et interpréta l'onde évanescente comme des particules sortant de leur

milieu pour y replonger ensuite comme des poissons sautant hors de l'eau. L'onde évanescente a ensuite été étudiée en détail par *Fresnel* (début du XIXème siècle). Il faut attendre 1947 pour que soit publiée une découverte importante : l'onde évanescente se déplace longitudinalement à l'interface (les poissons retombent dans l'eau plus loin que leur point de sortie) [*Goos and Hänchen, 1947*]. La première utilisation de l'onde évanescente en microscopie appliquée à la biologie remonte à 1956, par *Ambrose*. L'idée a ensuite été développée par *Axelrod* au début des années 1980 [*Axelrod, 1981*].

Le principe de l'onde évanescente repose sur les lois de *Snell-Descartes*. Ces lois décrivent le comportement d'un rayon lumineux changeant de milieu de propagation. Lorsqu'un rayon lumineux atteint une interface, une partie du rayon est réfléchi à un angle par rapport à la normale identique à l'angle d'incidence, l'autre partie est réfractée. L'angle du rayon lumineux réfracté par rapport à la normale dépend de l'indice de réfraction du milieu (lié à la vitesse de déplacement de la lumière dans ce milieu). Il est décrit par :

$$n_1 \sin i_1 = n_2 \sin i_2 \quad (1.1)$$

Avec n_1 l'indice de réfraction de la lumière du milieu d'incidence, i_1 l'angle avec la normale du rayon incident, n_2 l'indice de réfraction du milieu dans lequel le rayon lumineux sera réfracté, et i_2 l'angle avec la normale du rayon réfracté.

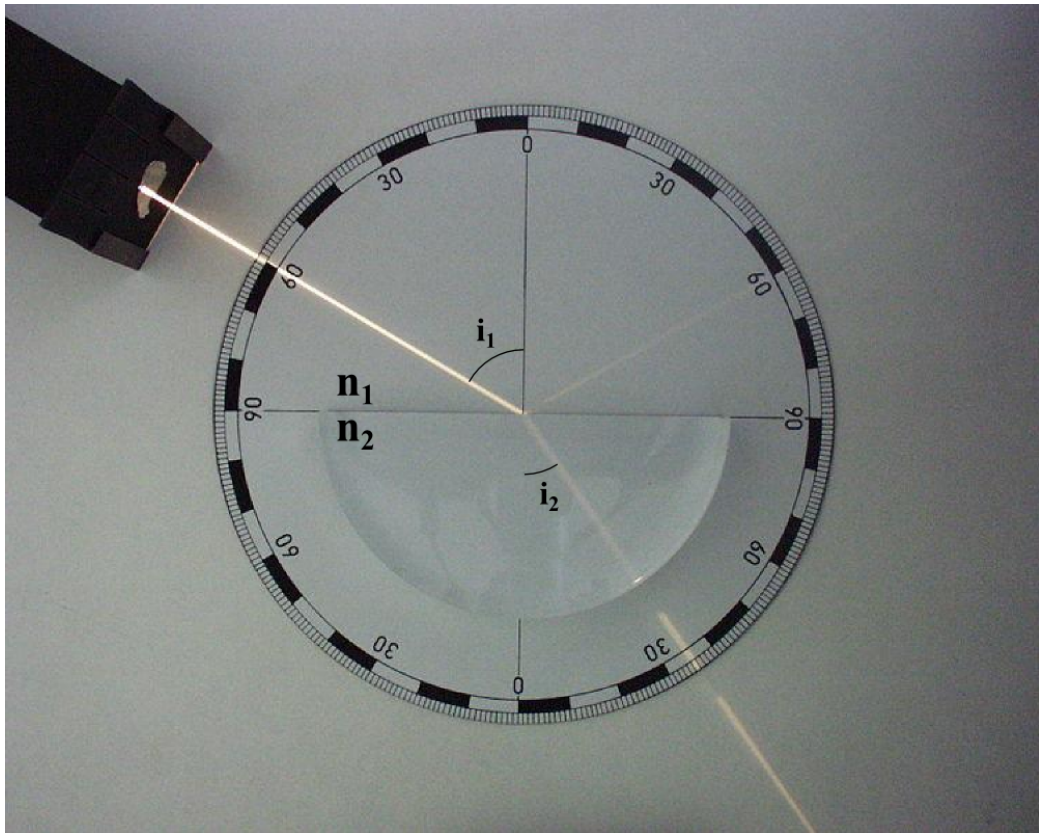


FIGURE 1.21 – Mise en évidence du rayon réfléchi et du rayon réfracté. Le rayon incident arrive avec un angle i_1 de 60° avec la normale dans l'air d'indice n_1 , et le rayon réfléchi (en haut à gauche) forme le même angle avec la normale. Le rayon réfracté est dévié de sa trajectoire et se rapproche de la normale car ici, l'indice du plexiglas est supérieur à l'indice de l'air. Le rayon n'est pas dévié lorsqu'il sort du plexiglas car il arrive perpendiculairement à l'interface. (Source : Wikipédia, Zátonyi Sándor).

Si l'indice n_1 est supérieur à l'indice n_2 , le rayon lumineux s'écarte de la normale. Si on augmente l'angle d'incidence, on peut atteindre un angle critique $i_{critique}$ pour lequel le rayon réfracté est perpendiculaire à la normale. Au-delà de cet angle critique, le rayon incident est totalement réfléchi. Ceci génère une onde évanescente qui se propage le long de l'interface. Cette onde évanescente est une onde électro-magnétique dont l'intensité $I(z)$ décroît exponentiellement avec la distance z à l'interface (voir FIGURE 1.9.3

page suivante) :

$$I(z) = I(0)e^{\frac{-z}{\delta}} \quad (1.2)$$

La distance caractéristique δ représente la distance à laquelle $\simeq 63\%$ de l'intensité initiale a été perdue. Elle est décrite par :

$$\delta = \frac{\lambda_0}{4\pi\sqrt{n_1^2 \sin^2 i_1 - n_2^2}} \quad (1.3)$$

avec λ_0 la longueur d'onde. La distance caractéristique δ est appelée profondeur d'évanescence. Elle dépend donc de la longueur d'onde, de l'angle d'incidence et des indices des milieux.

Pour appliquer cette technique à la microscopie, on dépose des cellules sur une surface de verre, dans un milieu aqueux. Un laser va être projeté sur l'interface verre / eau avec un angle supérieur à l'angle critique afin de générer l'onde évanescente. Cette onde évanescente va permettre l'excitation de molécules fluorescentes dans l'échantillon, sur une couche d'épaisseur $\sim 2d$, soit entre 200nm et 400nm avec les paramètres classiques des systèmes utilisés. Ceci permet d'observer l'échantillon à proximité de l'interface sans que les molécules fluorescentes hors du plan focal soient excitées et génèrent du bruit sur l'image.

Rappel des indices de réfractions :

	Indice de réfraction	
Air	1,0	
Eau	1,33	L'indice de réfraction de l'eau
Verre	1,5	
Membrane plasmique	1,45	
Cytosol	$\sim 1,33$	

varie peu avec sa concentration en solutés, l'indice du cytosol est donc proche de celui de l'eau.

Il existe deux types de montages : le laser peut être projeté soit par l'objectif servant à observer l'échantillon, soit par un prisme sous l'échantillon. Il est alors en général observé par un objectif à immersion à eau. Au laboratoire, nous avons un montage à prisme (voir FIGURE 1.9.3 page suivante).

L'utilisation de cette technique est particulièrement adaptée à l'étude de l'exocytose, puisqu'elle permet d'observer les événements se passant à proximité de la membrane plasmique qui est adhérente à l'interface. On peut alors observer la dynamique des vésicules au cours de la traversée du cortex d'actine, de l'arrimage, ou de la fusion. Pour cela, les granules sont marqués avec une protéine fluorescente (le neuropeptide-Y fusionné à la GFP le plus souvent). On peut alors observer les granules individuels, suivre leur trajectoire et l'analyser. Ces trajectoires permettent de caractériser différents comportements (mouvements dirigés, mouvements diffusifs, mouvements contraints, immobilité ; voir section 1.6.4 page 25). Elles permettent également d'observer une signature caractéristique lors de la fusion d'un granule marqué avec la membrane plasmique.

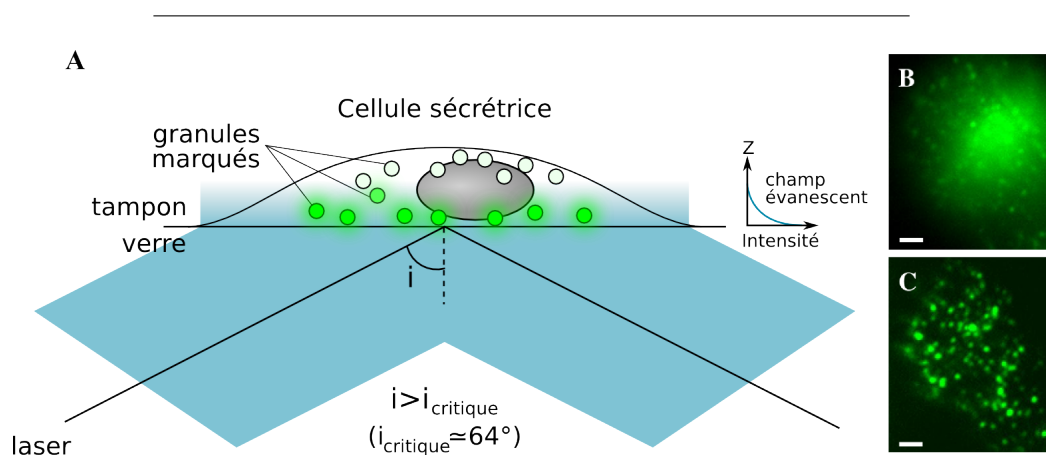


FIGURE 1.22 – **A**) Schéma de principe de la microscopie à onde évanescente. Des cellules sécrétrices sont déposées sur une surface de verre. Leurs granules sont marqués à l'aide d'un marqueur fluorescent. Un laser est dirigé vers la cellule avec un angle supérieur à l'angle critique. Il est alors totalement réfléchi par l'interface verre / milieu. Ceci génère une onde électro-magnétique évanescente dont l'intensité décroît exponentiellement avec la distance à l'interface. Ceci permet d'exciter spécifiquement les granules marqués dans une zone de $\sim 300\text{nm}$ à proximité de la membrane. Le signal est alors enregistré. **B-C**) Comparaison de deux images de la même cellule en épi-fluorescence (**B**) et en onde évanescente (**C**). On peut voir que le gain sur le rapport signal sur bruit permet de distinguer des granules individuels, ce qui permet le traitement et l'analyse des images.

Cette technique permet également un suivi en 3D des objets, car l'intensité d'excitation dépend de l'altitude z . La mesure de l'intensité des objets permet donc d'avoir une information sur leur position axiale.

La vidéo-microscopie à onde évanescente offre une moins bonne résolution temporelle ($\sim 10\text{Hz}$) que les méthodes électriques. Elle permet de résoudre les mouvements des vésicules, mais il est difficile de caractériser la dynamique d'évènements individuels de fusion. De plus, les objets observés sont à la limite de la résolution optique (250nm pour les granules des cellules neuro-endocrines, 50nm pour les vésicules synaptiques), il est donc parfois nécessaire de faire appel à des techniques super-résolutives ou à la microscopie électronique.

Microscopie de fluorescence super-résolutive : l'exemple du STED

Il existe de nombreuses techniques qui permettent de dépasser la limite de résolution optique. Cette limite correspond à la distance minimum que doit séparer deux objets ponctuels afin de pouvoir les différencier. Or, dans les systèmes optiques, compte tenu de la diffraction, l'imagerie d'un objet ponctuel donne une tâche de diffraction de taille $\lambda/2$ (avec λ la longueur d'onde). Dans les systèmes biologiques, la limite est typiquement de $\sim 200\text{nm}$.

Cependant, il existe de nombreuses techniques qui permettent de dépasser cette limite : la microscopie à champ proche (NSOM), l'illumination structurée (SIM), la localisation par photo-activation (PALM), la recombinaison de fluorescence stochastique (STORM), etc., ou la microscopie STED (STimulated Emission Depletion). La plupart de ces techniques reposent sur le balayage de l'échantillon et la reconstruction de l'image pixel par pixel. Elles nécessitent souvent des échantillons fixés, et n'apportent donc pas d'information dynamique. Cependant, elles permettent d'avoir des informations structurales très détaillées avec des résolutions inférieures à 40nm.

La microscopie STED repose sur l'utilisation de deux lasers impulsionsnels pour effectuer le balayage de l'échantillon :

- un laser d'excitation : ce laser de longueur d'onde située dans la bande

d'absorption de la molécule fluorescente d'intérêt excite un volume déterminé par la diffraction dans l'échantillon et le système optique.

- un laser de déplétion : l'impulsion de ce laser en forme d'anneau est émise juste après l'excitation. Ce laser de longueur d'onde située dans la bande d'émission de la molécule fluorescente. Ce laser n'excite pas la fluorescence mais provoque la désexcitation des molécules excitées par émission stimulée.

Seules les molécules situées au centre de l'anneau restent excitées et se relaxeront spontanément vers leur niveau d'énergie le plus bas avec émission de fluorescence. C'est ce signal qui est collecté. Ce signal apparaîtra comme une tâche de diffraction de plusieurs centaines de nanomètres, mais on sait qu'il est issu uniquement du centre de l'anneau. On peut donc attribuer le signal à la région située au centre de l'anneau.

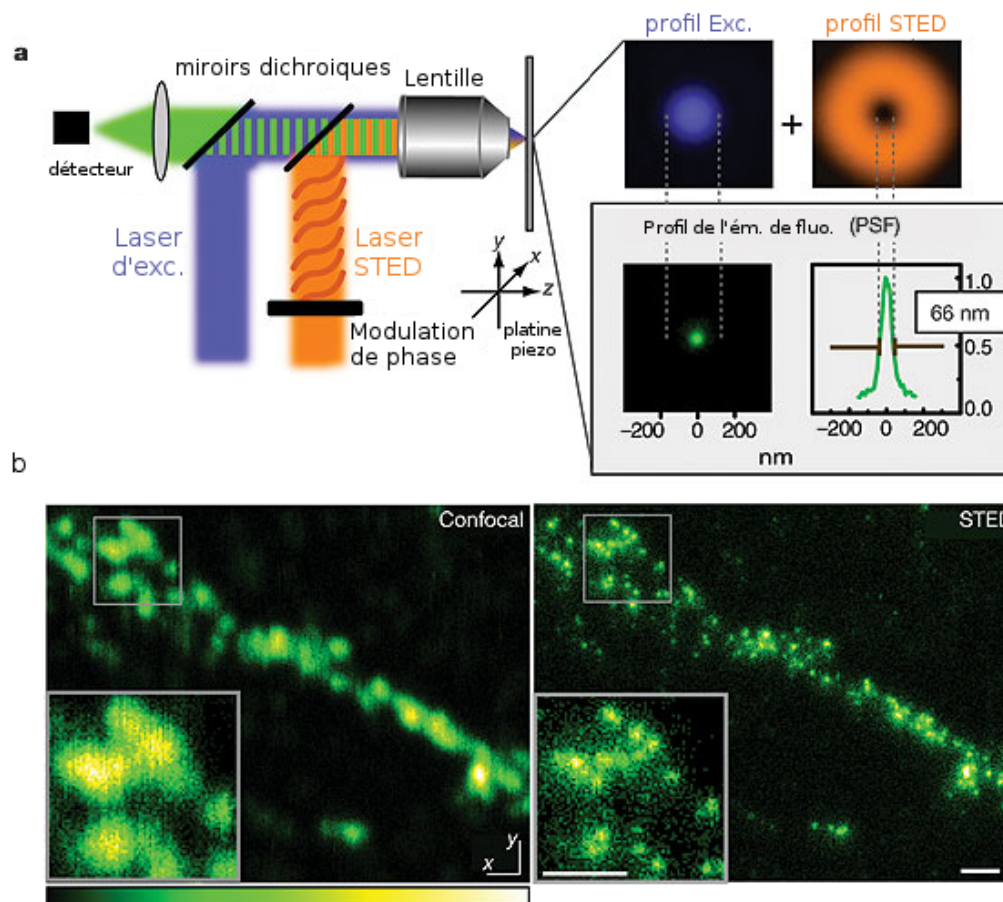


FIGURE 1.23 – a) Montage STED : deux lasers à impulsion sont superposés. Le premier permet l'excitation dans le bleu de la fluorescence. Le deuxième en forme d'anneau éteint la fluorescence par émission stimulée des molécules excitées. Le signal collecté par le détecteur est attribué aux molécules venant du centre de l'anneau. L'échantillon est balayé point par point pour reconstituer l'image. b) Comparaison de deux images de neurones dont la Synaptotagmine a été marquée par immuno-fluorescence en microscopie confocale (gauche) et en STED (droite). On peut voir le gain de résolution qui permet d'identifier des vésicules synaptiques individuelles. (Source : [Willig et al., 2006])

Cette technique permet de résoudre les granules de sécrétion et les vésicules synaptiques. Elle a permis de montrer par exemple qu'après l'exocytose, la Synaptotagmine restait agrégée dans la membrane plasmique [Willig et al., 2006].

Microscopie électronique

La microscopie électronique repose sur l'imagerie d'échantillons illuminés à l'aide d'un faisceau d'électrons. Contrairement à l'imagerie optique qui utilise des ondes électro-magnétiques, ici l'utilisation de longueurs d'onde beaucoup plus courtes (longueur d'onde de *de Broglie* de l'électron : 1 – 10pm suivant sa vitesse) permet de très forts agrandissements et une haute résolution.

La microscopie électronique repose sur le travail de *de Broglie*, et le premier modèle a été réalisé en 1931 par *Ernst Ruska* et *Max Knoll*. Ce modèle ne peut grossir les échantillons que 400 fois, mais les microscopes électroniques ont été largement améliorés depuis.

Il existe plusieurs méthodes : microscopie électronique à transmission, à balayage et par réflexion.

La microscopie électronique à transmission consiste à envoyer un flux d'électrons sur un échantillon fin et fixé. Certaines structures de l'échantillon denses aux électrons vont bloquer certains électrons. Le flux restant sera collecté, agrandi et révélé par projection sur un scintillateur, révélation photographique ou dirigé via un système optique vers une caméra CCD.

Lorsque la microscopie électronique est utilisée pour des échantillons biologiques, la méthode de fixation peut jouer un rôle critique sur ce qui est observable. En effet, afin d'observer des structures fines du cytosquelette, il est indispensable de recourir à des méthodes de congélation rapide sous haute pression, plutôt que des méthodes lentes de fixation chimique [Kiss et al., 1990, Weimer et al., 2006].

La microscopie électronique permet d'observer l'arrimage des vésicules de sécrétion à la membrane plasmique ou encore le pore de fusion.

1.10 Conclusion

Le processus de l'exocytose régulée est un phénomène physiologique complexe impliquant une série d'étapes successives faisant intervenir de nombreux acteurs. Les granules, après avoir été formés, vont être acheminés vers le cor-

tex d'actine. Une fraction des granules va traverser ce cortex d'actine afin de s'arrimer à la membrane plasmique. Cette étape implique Rab27, le recrutement de la Myosine Va et de la protéine adaptatrice Myrip, mais leurs rôles respectifs n'ont pas été complètement élucidés. Le complexe SNARE va se former au cours de l'amorçage à la fusion. Le granule sera alors prêt à fusionner suite à un stimulus qui augmente la concentration cytosolique du calcium. Lors d'une telle stimulation, les granules vont fusionner avec la membrane plasmique par formation d'un pore de fusion. Ce pore de fusion peut soit se refermer, soit se dilater. Cette étape nécessite le franchissement d'une barrière d'énergie, cependant la force qui permet la dilatation n'a pas été identifiée. Les granules seront ensuite recyclés de différentes façons suivant s'ils ont effectué une fusion complète ou un « Kiss & Run ». De nombreuses méthodes existent permettant l'analyse de l'exocytose, elles apportent cependant des informations très différentes et complémentaires.

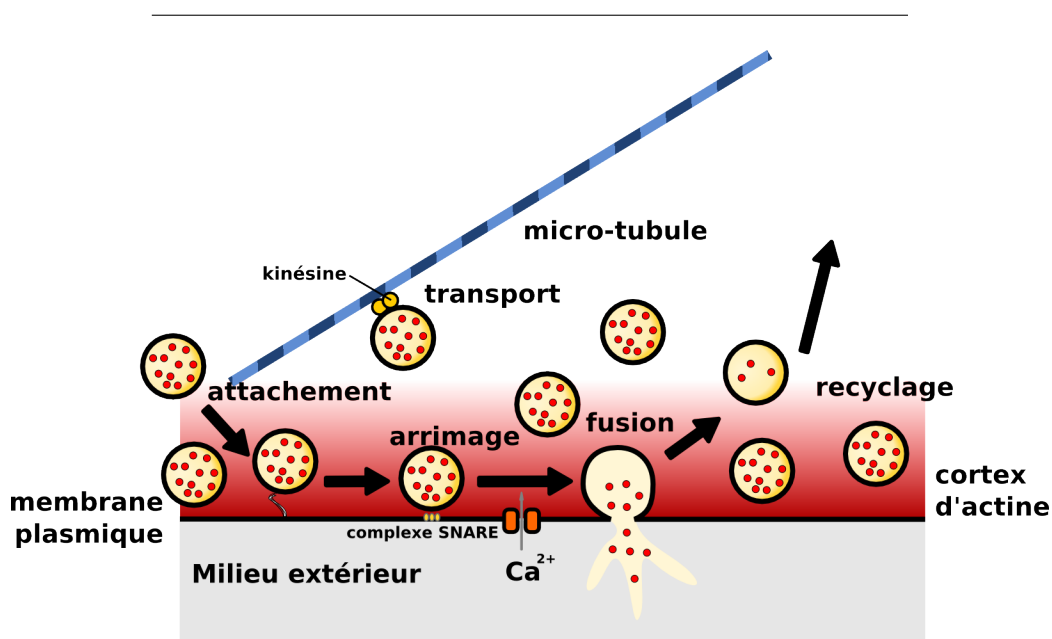


FIGURE 1.24 – Les granules de sécrétion sont formés au niveau du trans-Golgi, transportés le long des microtubules par les Kinésines jusqu’au cortex d’actine. Une fraction minoritaire des granules traverse le cortex d’actine, pour s’attacher à la membrane plasmique, s’arrimer, puis amorcer la fusion par formation du complexe SNARE. Lors d’un stimulus qui provoque l’entrée de calcium dans la cellule, les granules fusionnent avec la membrane plasmique, et forment un pore de fusion. Ce pore se dilate ou se referme libérant une fraction variable de leur contenu. Ils sont ensuite recyclés et peuvent être réintégrés plus ou moins rapidement dans le cycle de l’exocytose.

L’objectif de cette thèse est de s’intéresser à la dynamique des vésicules de sécrétion au cours de différentes étapes de l’exocytose.

Dans la première partie, nous avons étudié le rôle de Myrip dans l’exocytose. Nous avons voulu vérifier la formation du complexe Rab27a / Myrip / Myosine Va et son implication dans le trafic des granules, en particulier la rétention à la périphérie de la cellule et dans l’arrimage à la membrane plasmique.

Dans la deuxième partie, nous avons étudié la dilatation du pore de fusion. Cette étape apparaît comme une forte barrière énergétique, semble étroitement régulée et affecte le mode de fusion des granules de sécrétion. Nous avons étudié le rôle de la protéine Cdc42, une Rab GTPase qui régule la dynamique de l’actine, dans la dilatation du pore de fusion. Nous avons également proposé un mécanisme pour la dilatation du pore de fusion au travers de la régulation de la tension de la membrane plasmique.

Dans la troisième partie, nous avons développé un nouveau moyen d’investigation de l’exocytose : le couplage de l’ampérométrie et de l’imagerie à onde évanescente afin de tirer partie de la résolution temporelle de l’ampérométrie et de la résolution spatiale de l’imagerie. Nous avons développé cette méthode en collaboration avec *Frédéric Lemaître* (ENS, Paris) et avons fait une preuve de principe.

Myrip et l'arrimage à la membrane.

Myrip couple la rétention dans la zone subplasmalemale et l'arrimage à la membrane plasmique.

2.1 Introduction

Comme nous l'avons vu dans l'introduction (voir section 1.6.4 page 25), la traversée du cortex d'actine et l'arrimage à la membrane plasmique est une étape importante de l'exocytose. Ils permettent la constitution du groupe rapidement mobilisable de granules après l'amorce à la fusion par l'assemblage du complexe SNARE.

Le complexe Rab27a / Myrip / Myosine Va est formé à la surface des granules de sécrétion (voir section 1.6.1 page 19), et semble jouer un rôle dans la traversée du cortex d'actine (voir section 1.6.2 page 21) et dans l'arrimage à la membrane plasmique. Le rôle de Rab27a a été abondamment décrit, cependant, celui de Myrip et de la Myosine Va ne sont pas totalement élucidés.

2.1.1 Rab27a

La protéine Rab27a est exprimée dans de nombreux types cellulaires : dans les cellules sécrétrices de glandes endocrines ou exocrines, dans les cellules immunitaires ou dans les mélanocytes [Fukuda, 2008]. *Gomi et al.* ont

montré que Rab27a et Rab27b ne sont pas exprimées dans les mêmes régions mais que leur expression reste limitée aux cellules sécrétrices spécialisées, grâce à l'utilisation de souris exprimant *LacZ* (une des séquences de l'opéron lactose) sous le contrôle du promoteur de Rab27b [Gomi et al., 2007]. Dans le pancréas, l'expression de Rab27a est majoritaire dans les îlots de Langerhans, alors que c'est l'expression de Rab27b qui est majoritaire dans les cellules acineuses.

Rab27a est localisée sur les granules de sécrétion.

Rab27a a été identifiée sur les granules de sécrétion [Desnos et al., 2003, Fukuda et al., 2002, Tsuboi and Fukuda, 2006] (voir FIGURE 2.1.1).

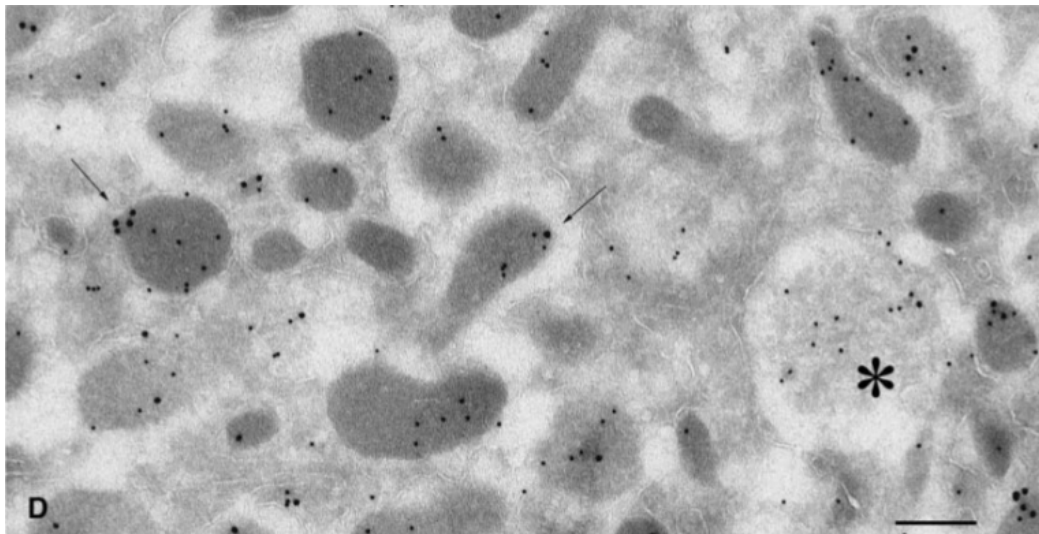


FIGURE 2.1 – Cryosections ultra-fines de cellules PC12 observées par microscopie électronique avec un immuno-marquage par billes d'or marquant Rab27a (billes de 15nm) ou la chromogranine A/B (billes de 10nm). Rab27a co-localise avec les granules de sécrétion (flèches) et les granules immatures (étoile). Échelle : 200nm. (Source : [Desnos et al., 2003]).

Rab27 peut être également trouvée sur d'autres organites de sécrétion, comme les mélanosomes [Seabra and Coudrier, 2004], les lysosomes de sécrétion [Ménasché et al., 2000, Stinchcombe et al., 2001], les corps multivésiculaires [Ostrowski et al., 2010], et les corps de Weibel-Palade [Hannah et al., 2003].

Dans les neurones Rab27b a été identifiée sur les vésicules synaptiques [Pavlos et al., 2010, Takamori et al., 2006].

Le cycle de Rab27a

Rab27a, comme les autres protéines Rab, a deux formes : liée à la guanosine tri-phosphate (GTP) ou liée à la guanosine di-phosphate (GDP). La forme GDP se trouve dans le cytosol, liée à l'inhibiteur de dissociation de la guanosine des Rabs (Rab guanosine nucléotide displacement inhibitor, Rab-GDI). La forme GTP est liée à la membrane des granules de sécrétion (voir section 2.1.1 page ci-contre) par un groupement géranylgeranyl. Rab-GDI intervient dans le cycle de Rab27a, et peut l'extraire des membranes ou l'y apporter [Pfeffer, 2003, Sakisaka et al., 2002]. Une mutation dans le gène *GDI1*, qui code pour aGDI, la forme la plus abondante de GDI dans le cerveau, provoque un syndrome du retard mental lié au chromosome X [D'Adamo et al., 1998]. Les souris n'exprimant pas aGDI ont des troubles de la mémoire à court terme et du comportement social [D'Adamo et al., 2002]. Le défaut sévère provoqué au niveau des synapses par l'absence d'aGDI peut être dû à un défaut du recyclage ou de l'adressage de Rab3 ou Rab27, mais également à l'inhibition des Rabs impliquées dans l'endocytose qui pourrait expliquer la réduction du nombre de vésicules synaptiques observées dans les terminaisons nerveuses [Bianchi et al., 2009]. Par analogie avec d'autres protéines Rabs, l'adressage de Rab27a est sans doute facilité par des facteurs de déplacement de GDI (GDI displacement factor, GDFs) [Pfeffer, 2003].

L'équilibre entre les formes Rab : GDP et Rab : GTP des protéines Rab dépend de trois paramètres :

- l'activité GTPase, qui est basse pour Rab27a [Itoh et al., 2005];
- l'activité des facteurs d'échange de guanosine de Rab (guanosine ex-

change factor, Rab-GEF) qui catalysent l'échange entre la GDP et la GTP ;

- et l'activité des activateurs de GTPase (GTPase activating protein, Rab-GAP)

Rab27a reste dans la membrane des granules et semble être liée de façon stable au GTP, et pourrait soit être rapidement réactivée par sa Rab-GEF, soit être résistante à l'extraction par GDI [Kondo et al., 2006]. La Rab-GAP spécifique pour Rab27 a été identifiée (EPI64/Rab27-GAP) [Itoh and Fukuda, 2006].

Effets sur l'exocytose régulée

RAB27a a été identifié comme étant le gène muté provoquant le syndrome de Griscelli de type II [Ménasché et al., 2000, Griscelli et al., 1978], et provoque la mutation « *ashen* » de la couleur du poil chez les souris. Le syndrome de Griscelli de type II est une maladie le plus souvent fatale qui combine l'albinisme et un syndrome hémophagocytaire (activation incontrôlée des lymphocytes et des macrophages) [Stinchcombe et al., 2004]. Au niveau cellulaire, l'absence d'expression de Rab27a perturbe le trafic des mélanosomes et l'exocytose des lysosomes dans les lymphocytes T [Ménasché et al., 2000, Stinchcombe et al., 2001, Haddad et al., 2001]. Dans les cellules dendritiques des souris « *ashen* », la présentation croisée d'antigènes est perturbée à cause d'une acidification prématurée des phagosomes [Jancic et al., 2007]. Cette acidification prématurée est due à la perturbation de l'adressage d'organites liés aux lysosomes contenant l'oxidase de NADPH Nox2 vers les phagosomes. Les souris « *ashen* » ont également une intolérance modérée au glucose qui est corrélée à la diminution de la sécrétion d'insuline déclenchée par le glucose [Kasai et al., 2005]. Ces données suggèrent l'intervention de Rab27a dans le trafic des organites de sécrétion et dans l'exocytose.

Il a été effectivement montré que la perturbation des fonctions de Rab27a diminue l'exocytose régulée dans les cellules neuro-endocrines [Yi et al., 2002, Desnos et al., 2003, Waselle et al., 2003, Gomi et al., 2005], les thrombocytes [Shirakawa et al., 2004] et dans les neutrophiles [Munafó et al., 2007, Herrero-

[Turrión et al., 2008, Johnson et al., 2010]. L'inhibition de l'expression de Rab27a (et de Rab27b) perturbe la sécrétion d'exosomes (vésicules contenues dans la lumière des corps multi-vésiculaires) [Ostrowski et al., 2010]. La sur-expression de Rab27a favorise la sécrétion dans les cellules endocrines [Yi et al., 2002, Fukuda et al., 2002].

L'effet de Rab27a sur l'exocytose peut-être expliqué par son intervention au cours de différentes étapes : la maturation (voir section 1.4.2 page 11), le recrutement des vésicules de sécrétion à la membrane (voir section 1.6.3 page 22) et l'amorce à la fusion (voir section 1.7.1 page 34).

Maturation Certaines données suggèrent l'implication de Rab27a dans la maturation. Rab27a peut être trouvée sur les granules de sécrétion immatures (voir FIGURE 2.1.1 page 88) [Desnos et al., 2003, Handley et al., 2007], mais seulement tardivement (20min après le bourgeonnement depuis le trans-Golgi) [Handley et al., 2007]. L'inhibition de différentes Rab GTPases (Rab3a, Rab3d, Rab27b) peut avoir une influence sur la taille des organites de sécrétion. Celle de Rab27a ou de son effecteur, la granophiline, augmente la taille des endosomes multi-vésiculaires dans les cellules HeLa [Ostrowski et al., 2010]. Cet effet pourrait être dû à l'augmentation de la fusion homotypique (voir section 1.4.2 page 11). Cet effet pourrait passer par le recrutement de Myrip et de la Myosine Va (voir section 2.1.2 page suivante) [Kögel et al., 2010].

Recrutement des granules de sécrétion à la membrane plasmique.

Rab27a intervient dans la répartition des granules à la périphérie de la cellule (voir section 1.6.2 page 21) grâce à ses effecteurs [Desnos et al., 2003, Tsuboi and Fukuda, 2006, Johnson et al., 2010, Desnos et al., 2007b]. Rab27a participe également à l'arrimage des granules à la membrane dans les lymphocytes T [Stinchcombe et al., 2001, Feldmann et al., 2003], les cellules pancréatiques β [Gomi et al., 2005], les cellules de la glande surrénale [Gomi et al., 2007] et dans les synapses de calmar [Yu et al., 2008], ainsi qu'à l'arrimage des endosomes multi-vésiculaires dans les cellules HeLa [Ostrowski et al., 2010]. Ces effets sont dus aux effecteurs de Rab27a.

Amorce de la fusion. Les données sur les liens entre l'amorce de la fusion et Rab27a sont contradictoires. La sécrétion d'insuline induite par le glucose est réduite dans les cellules β des souris « *ashen* », mais pas le nombre de granules rapidement libérables [Merrins and Stuenkel, 2008], ce qui suggère que Rab27a ne joue pas de rôle dans l'amorce à la fusion. Cependant, le groupe rapidement mobilisable se remplit plus lentement dans les cellules qui n'expriment pas Rab27a, ce qui suggère un rôle dans l'amorce à la fusion [Merrins and Stuenkel, 2008]. Cet effet pourrait être simplement dû au fait que l'absence d'expression de Rab27a diminue le nombre de vésicules de sécrétions arrimées à la membrane plasmique.

2.1.2 Myrip, protéine adaptatrice ?

Myrip a été identifiée comme effecteur de Rab27a par *Petit, Darchen et al.* dans l'épithélium pigmenté de la rétine [El-Amraoui et al., 2002]. Elle est présente dans de nombreux tissus de la souris (cerveau, peau, coeur, glande médullo-surrénale, pancréas, intestin, foie, reins, muscles, testicules, etc.)

Dans les cellules pigmentaires de la rétine, Myrip permet le recrutement de la Myosine VIIa sur les mélanosomes.

Anatomie de Myrip

Myrip est divisé en trois domaines :

- le domaine N-terminal qui permet la liaison à Rab27,
- le domaine de recrutement de la Myosine Va ou VIIa,
- le domaine C-terminal d'interaction avec l'actine.

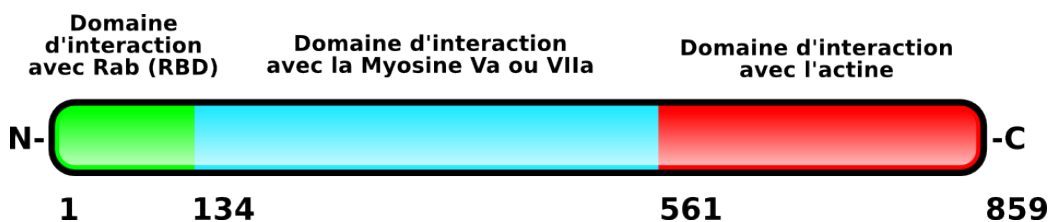


FIGURE 2.2 – Myrip est composé de trois domaines : 1–134 domaine d’interaction avec Rab ; 134–561 domaine d’interaction avec la Myosine Va ou VIIa ; 561–859 domaine d’interaction avec l’actine.

RBD, domaine d’interaction Rab. Le domaine N-terminal de Myrip est un domaine à doigts à zinc, fortement conservé entre l’humain et le rat (95% d’acides aminés identiques), qui possède huit résidus cystéine qui lient deux Zn^{2+} [El-Amraoui et al., 2002]. Ce domaine est homologue au domaine d’interaction avec Rab3a de la Rabphiline 3a, Rim et Noc2, ainsi qu’avec le domaine d’homologie de Slp2 (SHD) de deux membres de la famille des analogues de la synaptotagmine (Synaptotagmin-like protein, Slp), Slp2 et Slp3 (30% d’acides aminés identiques) et Slac2a/Mélanophiline (50% d’acides aminés identiques). Les analyses cristallographiques du domaine à doigt à zinc de la Rabphiline 3A montrent l’implication d’une séquence SGAWF(F/Y) dans la liaison à Rab3 [Ostermeier and Brunger, 1999]. Une séquence analogue bien que non identique est présente dans Myrip : SLEWFY. Cependant, la substitution des trois résidus WFY par des alanines ne perturbe pas la liaison à Rab27a [El-Amraoui et al., 2002].

Myrip se lie spécifiquement à Rab27a et pas à d’autres protéines Rabs (notamment Rab3a,b,c,d) [El-Amraoui et al., 2002, Fukuda and Kuroda, 2002].

Domaine d’interaction Myosine Va. Le domaine central de Myrip se lie à la Myosine Va et à la Myosine VIIa : ces dernières co-immunoprécipitent avec Myrip, mais pas avec une construction tronquée de Myrip ne contenant que le domaine de liaison avec Rab (Acides aminés 1–134, Myrip-RBD). Myrip et la Myosine VIIa co-localisent dans l’épithélium de rétine sur les mélanosomes [El-Amraoui et al., 2002, Fukuda and Kuroda, 2002]. Myrip et sa construction tronquée Myrip- ΔC (1–561) recrutent de la Myosine VIIa sur les granules de sécrétion dans les cellules PC12, mais pas la construction tronquée Myrip-RBD [El-Amraoui et al., 2002].

Domaine d'interaction avec l'actine. Le domaine C-terminal de Myrip co-immunoprécipite avec l'actine dans les extraits cellulaires de COS-7 [Fukuda and Kuroda, 2002]. De plus, Myrip co-immunoprécipite avec l'actine purifiée filamenteuse ou globulaire. Lorsque ce domaine est sur-exprimé dans les cellules PC12, il co-localise avec les filaments d'actine [Fukuda and Kuroda, 2002, Desnos et al., 2003].

Myrip peut donc recruter la Myosine Va qui joue un rôle important dans le trafic des granules de sécrétion (voir section 2.1.2). Cependant, Myrip possède également un domaine d'interaction avec l'actine qui suggère un rôle propre de Myrip indépendamment du simple recrutement de la Myosine Va.

Rôle de Myrip dans l'exocytose.

Desnos et al. ont montré que Myrip était responsable du rôle de Rab27a dans le recrutement des granules vers la membrane plasmique. Rab27a et Myrip sont localisés sur les granules de sécrétion des cellules PC12 [Desnos et al., 2003, Fukuda and Kuroda, 2002]. On retrouve cette localisation dans les cellules qui sécrètent de l'insuline [Waselle et al., 2003].

L'augmentation de l'activité de Rab27a ou la sur-expression de Myrip inhibent la sécrétion des cellules PC12, alors que la sur-expression de Myrip-RBD n'a pas d'effet sur l'exocytose. Cet effet est probablement dû à une liaison trop importante à l'actine des granules de sécrétion via la Myosine Va ou directement via le domaine C-terminal de Myrip. En effet, l'utilisation de la latrunculine qui dépolymérise l'actine réduit l'effet inhibiteur de Rab27a et de Myrip, alors que l'utilisation de la jasplakinolide qui stabilise le cortex d'actine le renforce. De plus, cet effet n'est pas observé lorsqu'on sur-exprime Myrip- Δ C, suggérant un rôle du domaine C-terminal de Myrip et une interaction directe à l'actine. Le suivi des granules de sécrétion en imagerie à onde évanescente révèle que la sur-expression de Myrip ou l'augmentation de l'activité de Rab27a réduisent leur mobilité. Ces données suggèrent que Myrip séquestre les granules de sécrétion dans le cortex d'actine [Desnos et al., 2003].

2.1.3 Myosine Va

La Myosine Va est recrutée *in vitro* par Myrip au niveau de son domaine central. Le rôle de la Myosine Va dans l'exocytose et le trafic des granules de sécrétion a été observé par plusieurs groupes, même si son rôle précis dans les cellules neuro-endocrines reste éluif.

La Myosine Va est un moteur processif constitué d'une queue globulaire qui se lie à Myrip, d'un « cou » et d'une tête globulaire qui se lient à l'actine (voir FIGURE 2.1.3). Elle fonctionne en dimères.

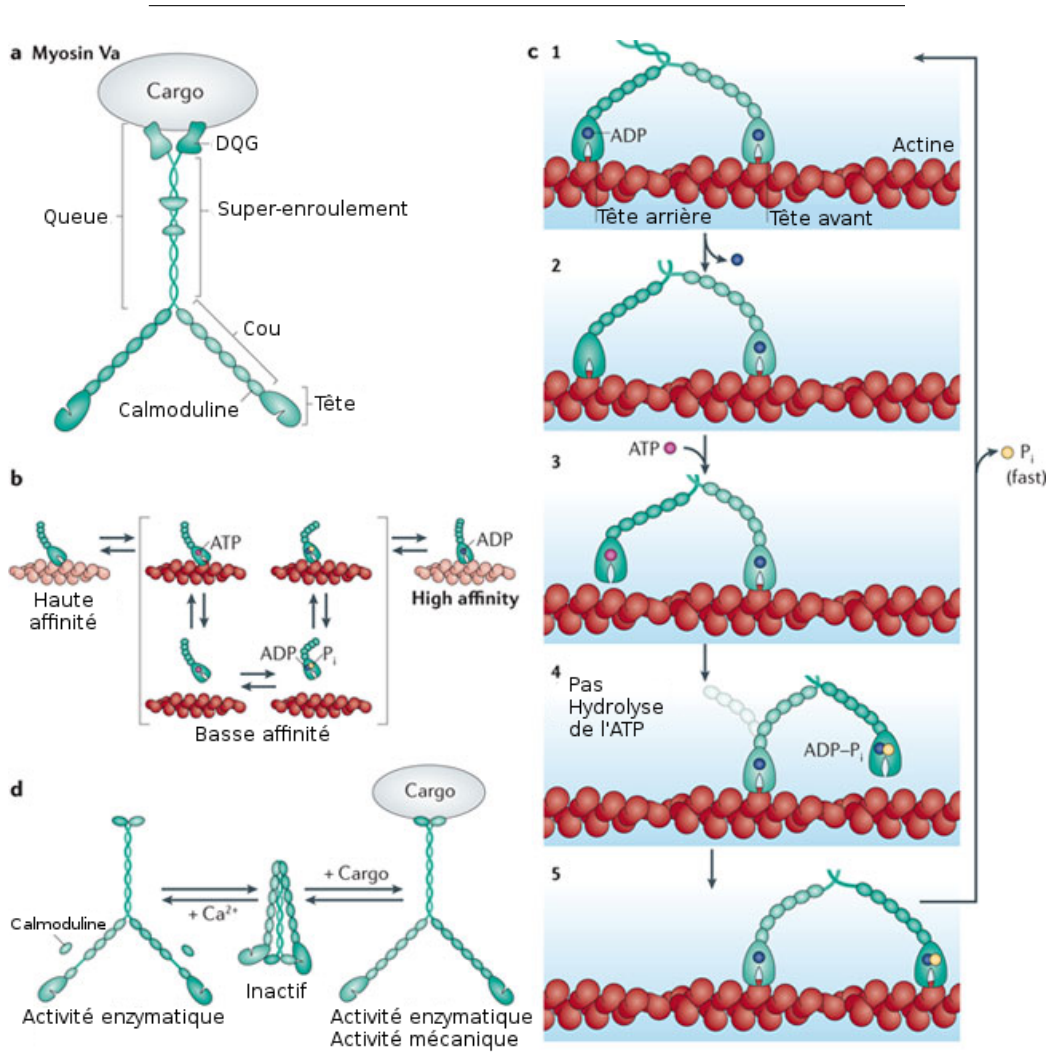


FIGURE 2.3 – **a)** Structure de la Myosine Va. La tête, appelée également domaine moteur, contient un site de liaison à l'actine et un site de liaison à l'ATP. Le cou contient six tandems de motifs IQ; chacun d'entre eux peut se lier à la calmoduline. La queue est formée par un super-enroulement avec des interruptions périodiques, qui lie deux chaînes lourdes et deux domaines de queues globulaires (DQT). Ces DQTs se lient à Myrip. **b)** Cycle cinétique de la Myosine Va. Le cycle alterne entre des états avec une forte affinité pour l'actine (Myosine Va sans nucléotide, et Myosine Va liée à l'ADP), et des états avec une faible affinité pour l'actine (Myosine Va liée à l'ATP ou à l'ADP et un phosphate inorganique (P_i)). La libération de l'ADP du complexe d'acto-myosine est l'étape cinétiquement limitante. **c)** Mécanisme du mouvement processif le long de l'actine de la Myosine Va. La Myosine Va reste probablement longtemps dans un état avec l'ADP lié à ses deux têtes (1), la tension exercée des deux têtes l'une sur l'autre provoque la libération de l'ADP de la tête arrière (2). Cette tête lie alors l'ATP et se dissocie rapidement de l'actine (3). La tête attachée à l'actine effectue une bascule, positionnant la tête détachée vers l'avant (liée à l'ADP et P_i). La nouvelle tête avant interagit avec un site de fixation (4). Lors de la liaison avec l'actine (5), la tête avant libère rapidement son P_i et établit une conformation de liaison forte, qui ramène la Myosine Va dans le même état qu'à l'étape (1), mais ayant fait un pas de 36nm. **d)** Régulation de la Myosine Va. En l'absence de calcium ou d'un cargo, la Myosine Va adopte une conformation repliée qui ne présente pas d'activité mécanique ou enzymatique (hydrolyse de l'ATP), dans laquelle les domaines moteurs interagissent avec le domaine de liaison au cargo. En présence de calcium, la Myosine Va se déplie en une conformation qui a une forte activité enzymatique mais ne peut pas se mouvoir le long de l'actine parce que le cou est affaibli par l'absence de calmoduline. Lorsque le cargo se lie, la Myosine Va se déplie et présente une activité enzymatique et mécanique. (*Source : [Hammer and Sellers, 2012]*)

La Myosine Va est recrutée sur les granules de sécrétion dans les cellules chromaffines et dans les cellules qui sécrètent de l'insuline [Rosé et al., 2003, Rudolf et al., 2003, Varadi et al., 2005, Ivarsson et al., 2005, Desnos et al., 2007b]. Cependant, la Myosine Va n'est pas uniquement localisée sur les granules de sécrétion, ce qui suggère différents rôles dans la cellule. C'est probablement Myrip qui recrute la Myosine Va sur les granules de sécrétion, mais cela n'a pas été formellement montré.

Dans les cellules chromaffines [Rosé et al., 2003] et dans les cellules β

du pancréas [Varadi et al., 2005, Ivarsson et al., 2005], l'inhibition de la Myosine Va réduit l'exocytose. Cet effet est similaire à celui de l'inhibition de l'expression de Rab27 ou de Myrip [Waselle et al., 2003, Ivarsson et al., 2005].

La fonction de moteur de la Myosine Va suggère qu'elle pourrait jouer un rôle dans le transport des granules vers les sites d'exocytose. Cependant, aucun mouvement d'adressage des granules aux sites de fusion propres à la Myosine Va n'a pu être identifié dans les cellules neuro-endocrines. Dans les neurones, en revanche, il a été montré que la Myosine Vb transporte les endosomes en présence de calcium dans les épines dendritiques [Wang et al., 2008]. La sur-expression d'un dominant négatif de la Myosine Va (la queue globulaire privée des domaines moteurs, voir FIGURE 2.1.3 page 95) : MyoVa-tail provoque l'agrégation des granules de sécrétion dans les cellules PC12 [Rudolf et al., 2003], et dans les cellules à insuline [Varadi et al., 2005]. Cette observation pourrait cependant être due à la dimérisation de la MyoVa-tail. La baisse de l'activité de la Myosine Va diminue la densité des granules de sécrétion observées en imagerie à onde évanescente dans les cellules neuro-endocrines, et provoque une redistribution des granules vers la zone péri-nucléaire [Varadi et al., 2005, Desnos et al., 2007b]. L'inhibition de l'expression de la Myosine Va dans les cellules endothéliales provoque le même effet [Rojo Pulido et al., 2011]. La Myosine Va pourrait donc intervenir dans la rétention des granules de sécrétion à la périphérie de la cellule.

La Myosine Va joue également un rôle dans l'arrimage à la membrane plasmique. L'observation des granules de sécrétion par imagerie à onde évanescente montre une réduction du nombre de granules immobilisés à la membrane plasmique de façon stable ($> 15s$) [Desnos et al., 2007b]. Ce rôle pourrait passer par l'interaction avec la Syntaxine 1 [Watanabe et al., 2005], membre du complexe SNARE qui participe avec Munc 18 à l'arrimage à la membrane (voir section 1.6.4 page 28) [Toonen et al., 2006].

Il a été récemment montré que la Myosine Va joue un rôle important dans la maturation des granules de sécrétion au travers de l'élimination de la Furine (voir section 1.4.2 page 11) [Kögel et al., 2010]. Cet effet pourrait expliquer également l'effet de Rab27a sur la maturation.

2.1.4 Cortex d'actine

Le cortex d'actine joue de nombreux rôles dans l'exocytose, et interagit en particulier avec Myrip et la Myosine Va (voir section 3.1.1 page 147). En bref, le cortex d'actine est une couche de filaments d'actine entre 200nm et 400nm. C'est un réseau dense de mailles plus petites que les granules de sécrétion, mais qui dispose de cages polygonales pouvant accueillir des objets de la taille des granules. Le cortex est très dynamique, et passe par des phases de polymérisation et de dépolymérisation rapides. Il restreint la mobilité des granules qui s'y trouvent.

2.1.5 Hypothèses et objectifs

Notre objectif était d'étudier le rôle de Myrip dans l'exocytose. En effet, la sur-expression de Myrip réduit la mobilité des granules de sécrétion dans le réseau d'actine, mais cet effet pourrait être dû au recrutement de la Myosine Va ou à une autre action de Myrip, en particulier de son domaine C-terminal qui interagit avec l'actine.

Nous avons donc étudié :

- le rôle de Myrip dans le recrutement de la Myosine Va (postulé mais pas démontré),
- les rôles respectifs de Myrip et de la Myosine Va dans la mobilité des granules de sécrétion et leur arrimage à la membrane plasmique,
- si les effets de Myrip sont médiés par la Myosine Va ou s'il existe un rôle supplémentaire de Myrip.

Au cours de ce travail, nous avons développé une nouvelle méthode d'analyse de la rétention des granules à la périphérie de la cellule à l'aide de la photo-activation.

2.2 Résultats

Ma contribution dans ce travail a principalement été la mise au point de la technique de photo-activation. J'ai également contribué à l'acquisition de

certaines données expérimentales et au développement de méthodes d'analyse d'image (distance des granules au noyau, altitude des périodes d'arrimage).

2.2.1 Myrip peut s'associer à Rab27a et à la Myosine Va

Desnos et al. suggèrent que Rab27a, Myrip et la Myosine Va forment un complexe localisé à la surface des granules de sécrétion [[Desnos et al., 2003](#), [Desnos et al., 2007b](#)]. Afin de tester cette possibilité, nous avons sur-exprimé la queue globulaire de la Myosine Va (MyoVa-tail) fusionnée avec la protéine fluorescente verte (GFP), ainsi que le neuropeptide-Y (NPY) fusionné à la protéine fluorescente rouge monomérique (mRFP). Dans les cellules contrôle, 60% des granules marqués avec NPY-mRFP sont également associés à la Myosine Va. Lorsqu'on inhibe l'expression de Myrip avec un petit ARN interférant (pARNi), ce pourcentage est réduit à 20%. Le phénotype peut être restauré par la sur-expression d'une forme résistante au pARNi de Myrip. Dans environ 60% des cellules traitées par le pARNi, le marquage de la GFP-MyoVa-tail est soluble et ne montre aucun enrichissement sur des structures intracellulaires, contre 22% dans les contrôles. L'intensité du signal soluble, hors des structures, est doublé dans les cellules traitées avec le pARNi (intensité moyenne de fluorescence, cellules contrôle, 288 ± 32 ; pARNi, 595 ± 58 ; $p < 0.0001$; $n = 30$ cellules).

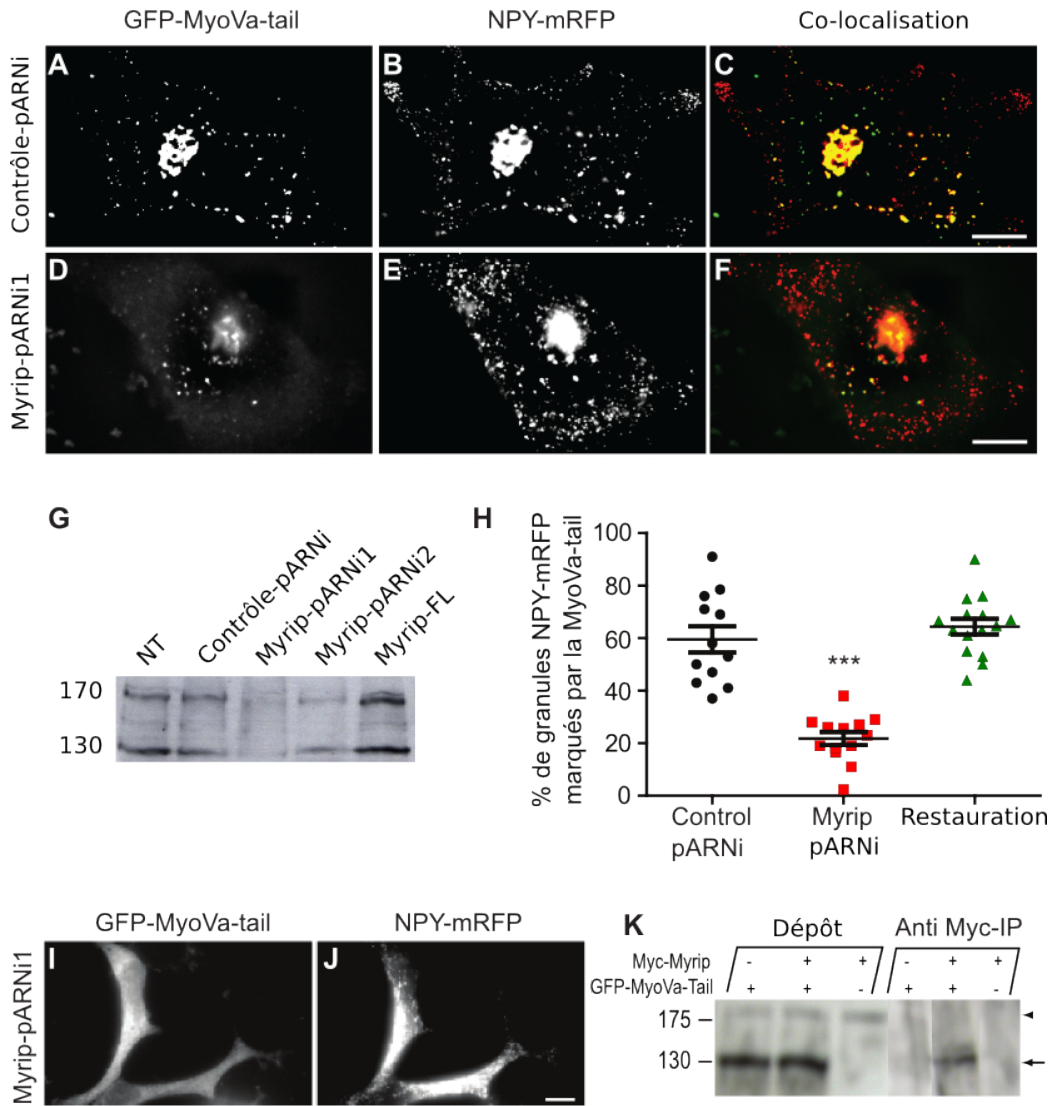


FIGURE 2.4 – **A-F**) Les cellules BON ont été transfectées successivement avec NPY-mRFP, (**B-E**) et avec la GFP-MyoVa-tail (**A, D**) 3 jours et 16h avant la fixation des cellules, respectivement. Les cellules ont également été transfectées avec un pARNi contre la luciférase pour les contrôles (**A-C**), ou avec un pARNi contre Myrip (**D-F**). Des piles d'image en Z ont été déconvoluées. **G**) Inhibition de l'expression de Myrip. Trois jours après transfection, les cellules ont été analysées par immuno-détection dans les cellules non transfectées (NT), dans les cellules traitées avec un pARNi contrôle, avec un pARNi contre Myrip, et dans des cellules sur-exprimant Myrip-FL. La quantité de Myrip a été diminuée de $80 \pm 1,8\%$ (Myrip-pARNi1) ou de $63 \pm 1,8\%$ (Myrip-pARNi; $n = 3$). Un gel typique est montré. **H**) Diagramme en point du pourcentage de granules marqués par NPY-mRFP également marqués par la GFP-MyoVa-tail (une construction composée de la queue globulaire de la Myosine Va et les exons A, C, E et F). L'adressage de la GFP-MyoVa-tail aux granules est réduite par l'inhibition de l'expression de Myrip, et restaurée par la sur-expression d'un mutant de Myrip résistant au pARNi ($p < 0,0001$, ANOVA). Les astérisques correspondent au post-test de Tukey $p < 0,001$; $n = 15$ cellules provenant de deux expériences indépendantes. Les cellules exprimant le mutant de Myrip résistant au pARNi ont été identifiées à l'aide d'un anticorps anti-c-Myc et d'un anticorps secondaire marqué avec Alexa-350. L'expression de la GFP-MyoVa-tail n'est pas réduite par l'inhibition de l'expression de Myrip. **I, J**) Dans $\sim 60\%$ des cellules Myrip-pARNi, la GFP-MyoVa-tail apparaît soluble dans le cytosol. **K**) Co-immunoprécipitation de Myrip et de la Myosine Va. La co-immunoprécipitation de la GFP-MyoVa-tail avec Myrip étiqueté avec Myc après l'expression dans les cellules BON. L'immunoprécipitation a été effectuée avec un anticorps anti-Myc et l'immuno-détection avec un anti-corps anti-MyoVa. Un quinzième de l'extrait des cellules et un quart de l'immunoprécipitation ont été analysés. Les positions de la Myosine Va et de la MyoVa-tail sont montrées respectivement par la tête de flèche et par une flèche. Échelle 5 μ m.

2.2.2 Myrip joue un rôle dans la distribution des vésicules en les retenant dans la zone subplasmale-male

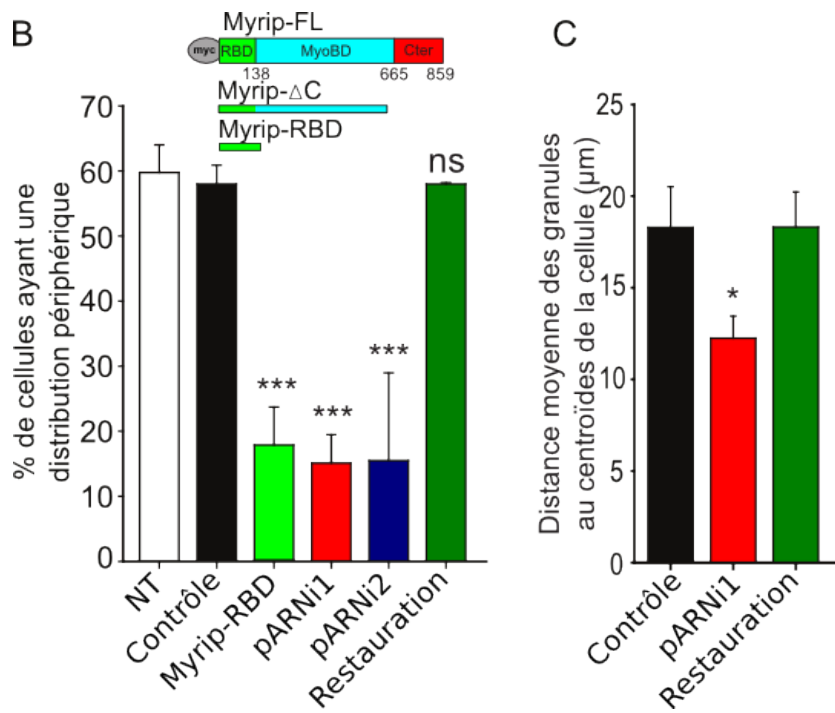
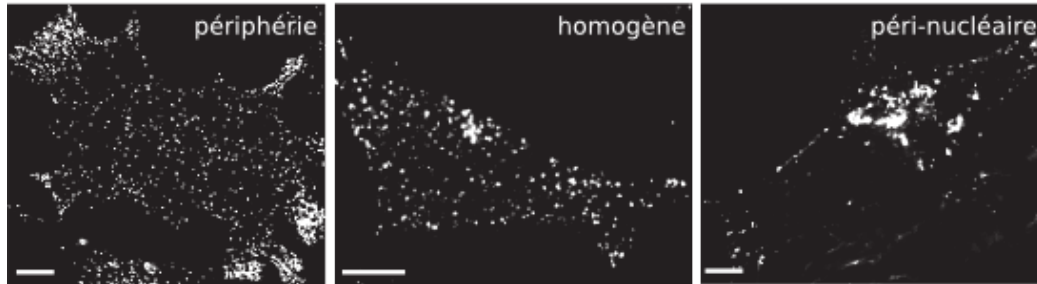
Les granules de sécrétion sont à la périphérie des cellules BON. En revanche, dans les cellules traitées avec Myrip-pARNi, les granules sont soit

distribués homogènement dans la cellule, soit concentrés dans la zone péri-nucléaire. On retrouve ce phénotype également dans les cellules qui sur-expriment une construction de Myrip tronquée qui ne possède que le domaine de liaison à Rab27 (voir section 2.1.2 page 92) (Myrip-RBD). Cette construction inhibe la liaison de Myrip endogène avec Rab27a.

Pour quantifier cet effet, les cellules ont été classifiées manuellement, en utilisant le critère suivant : les cellules ayant au moins une extension dont la densité des granules était supérieure à celle du centre de la cellule ont été comptées comme ayant une distribution périphérique (voir FIGURE 2.2.2 page suivante A,B). Une analyse complémentaire automatisée mesurant la distance des granules de sécrétion au centroïde de la cellule confirme les résultats précédents en montrant une diminution de la distance moyenne des granules au centroïde dans les conditions Myrip-pARNi. Le phénotype peut être restauré par sur-expression d'un mutant de Myrip résistant au pARNi (voir FIGURE 2.2.2 page ci-contre C).

L'observation des granules présents dans la zone subplasmalemmale par imagerie à onde évanescente révèle que l'inhibition de l'expression de Myrip ou la sur-expression de Myrip-RBD diminuent la densité des granules. À l'inverse, la sur-expression de Myrip (Myrip-FL) tend à augmenter la densité des granules dans la zone subplasmalemmale. La sur-expression de Myrip- Δ C, une construction de Myrip tronquée comportant les domaines d'interaction avec Rab27 et la Myosine Va, mais pas l'extrémité C-terminale (acides aminés de 1 à 665) n'augmente pas la densité des granules. Ces observations ayant été faites avec une profondeur d'évanescence $\delta = 150\text{nm}$, la taille de la zone observée est donc de $\sim 300\text{nm}$. À cette distance d'observation, la plus part des granules se trouvent dans le cortex d'actine [Oheim and Stühmer, 2000, Johns et al., 2001, Huet et al., 2006]. Ceci suggère que le domaine C-terminal qui n'est pas nécessaire au recrutement de la Myosine Va [Desnos et al., 2003, Kuroda and Fukuda, 2005] interagit directement avec l'actine. Myrip participe donc à la rétention des granules près de la membrane plasmique.

A



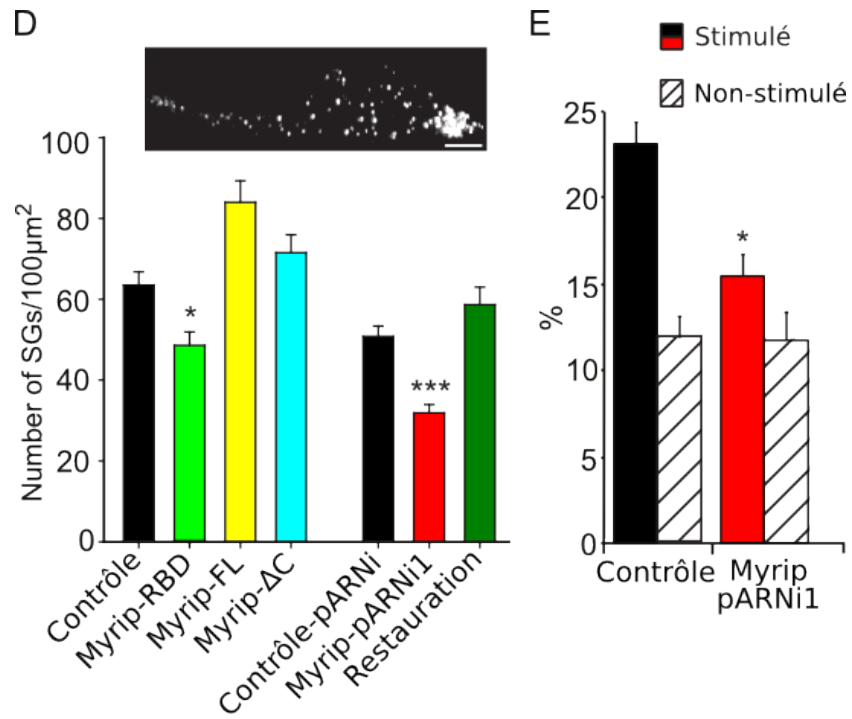


FIGURE 2.5 – **A)** Des cellules BON ont été transfectées avec un duplex d'ARN interférent ou une construction marquée Myc. La distribution intracellulaire des granules a été analysée 3 jours plus tard. Les granules ont été marqués à l'aide d'un anti-corps anti-chromogranine A/B ou par transfection de NPY-GFP. Les granules sont le plus souvent enrichis à la périphérie de la cellule et dans les extensions cellulaires (gauche). Cependant, lors de l'inhibition de l'expression de Myrip ou la sur-expression de Myrip-RBD, les granules sont souvent homogènement répartis dans la cellule (milieu) ou concentrés dans la région péri-nucléaire (droite). **B)** Pourcentage moyen (\pm erreur standard) de cellules avec un enrichissement périphérique des granules observé dans les conditions contrôle (NT, non transfecté, $n = 139$ cellules pour 4 expériences indépendantes; contrôle, $n = 255$ cellules pour 6 expériences indépendantes), sur-expression de Myrip-RBD ($n = 109$ pour 4 expériences indépendantes), Myrip-pARNi1 ($n = 190$ cellules pour 6 expériences indépendantes), Myrip-pARNi2 ($n = 125$ cellules pour 3 expériences indépendantes), et Myrip-pARNi1 sur-exprimant un mutant de Myrip résistant au pARNi (Restauration, $n = 81$ cellules pour 2 expériences indépendantes). Encart, schéma des constructions Myrip utilisées au cours de cette étude. $p < 0,0001$ (ANOVA), $***p < 0,001$ (post-test de Tukey); ns, non significatif. **C)** Pour quantifier la distribution cellulaire des granules de sécrétion, les images d'épifluorescence de cellules sur-exprimant NPY-GFP ont été segmentées à l'aide du logiciel MIA. Pour chaque cellule, la distance moyenne des pixels appartenant aux granules au centroïde de l'empreinte de la cellule a été calculée. Le diagramme montre les moyennes (\pm erreur standard) des valeurs obtenues dans 10 cellules par condition. $p = 0,0388$ (ANOVA). **D)** Des cellules BON ont été transfectées avec un vecteur vide (Contrôle, $n = 39$ cellules pour 2 expériences indépendantes), un duplex pARNi (Contrôle-pARNi, $n = 107$ cellules pour 7 expériences indépendantes), ou avec un vecteur codant pour Myrip-RBD ($n = 42$ cellules pour 2 expériences indépendantes), Myrip-FL ($n = 38$ cellules pour 2 expériences indépendantes), Myrip- ΔC ($n = 38$ pour 2 expériences indépendantes), ou avec Myrip-pARNi1 ($n = 96$ cellules pour 7 expériences indépendantes) et une construction de restauration ($n = 20$ cellules pour 2 expériences indépendantes). Elles ont également été co-transfectées avec un vecteur codant pour NPY-mRFP afin de marquer les granules. Les cellules ont été observées en imagerie à onde évanescente. Encart : une image représentative d'une cellule BON. **E)** Des cellules BON ont été traitées avec des pARNi contrôle, ou avec des pARNi contre Myrip. 3 jours plus tard, elles ont été chargées avec de la [^3H]sérotonine, lavées, et stimulées avec une solution de Locke supplémentée avec 3,7mM de Ba^{2+} (barres noires et rouges) pendant 10min ou incubées dans un bain non stimulant sans Ba^{2+} pour la même durée (barres rayées). La [^3H]sérotonine a été mesurée dans le milieu extra-cellulaire et exprimé comme un pourcentage de la [^3H]sérotonine contenue dans la cellule (moyenne \pm erreur standard de 6–15 puits. Échelle : 5 μm . $*p < 0,05$; $***p < 0,001$.

Afin de déterminer la distance des granules à la membrane plasmique, des observations en microscopie électronique ont été effectuées. Après 3 jours de traitement par pARNi contrôle ou Myrip, les cellules ont été fixées par congélation rapide à haute pression. Cette technique préserve la distance des granules à la membrane plasmique [Siksou et al., 2009]. Les granules à coeur dense aux électrons ont été identifiés, et leur distance à la membrane plasmique a été mesurée. Les résultats d'imagerie à onde évanescente sont confirmés : le nombre de granules à moins de 300nm de la membrane plasmique est diminué dans les conditions Myrip-pARNi. L'effet sur les granules très proche de la membrane ($< 50\text{nm}$) et sur ceux qui sont en contact avec la membrane ($< 15\text{nm}$) est encore plus prononcé. Le nombre total de granules n'est pas affecté (cellules contrôles, $2, 17 \pm 0, 27 \text{ granules}/\text{m}^2$, $n = 32$ cellules ; cellules Myrip-pARNi, $2, 32 \pm 0, 54 \text{ granules}/\text{m}^2$, $n = 30$ cellules).

Cette réduction du nombre de granules arrimés à la membrane plasmique est accompagnée logiquement d'une diminution de la sécrétion de la sérotonine dans les cellules BON dont l'expression de Myrip a été inhibée, comme dans les autres cellules neuro-endocrines [Fukuda and Kuroda, 2002, Desnos et al., 2003, Waselle et al., 2003, Imai et al., 2004, Ivarsson et al., 2005, Mizuno-Kamiya et al., 2001].

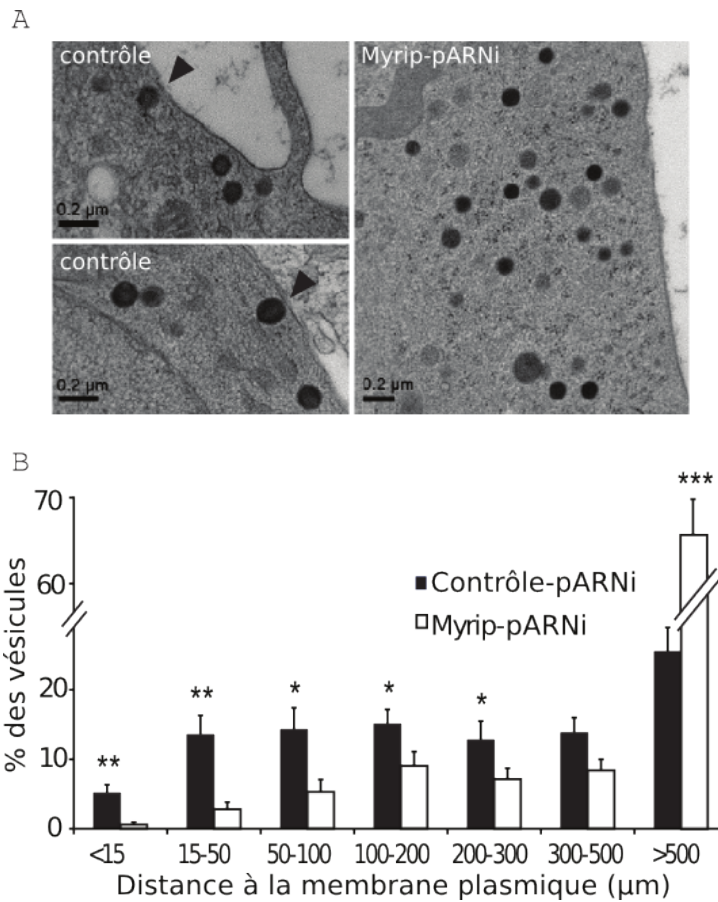
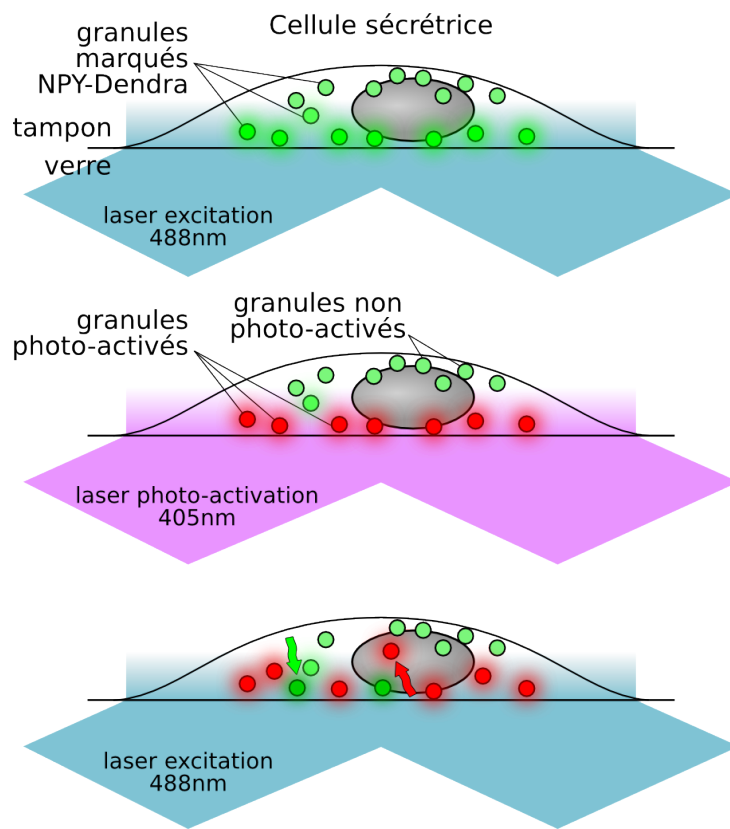


FIGURE 2.6 – Microscopie électronique des granules dans les cellules BON. **A)** Cryosection ultra-fine de cellule BON. Des cellules BON ont été traitées avec un duplex pARNi contrôle ou avec un duplex pARNi Myrip, congelées sous haute pression pour conserver l’architecture de la cellule, et imagées en microscopie électronique. Les têtes de flèche indiquent les granules de sécrétion proches de la membrane plasmique. **B)** L’inhibition de l’expression de Myrip modifie la localisation des granules de sécrétion. La figure montre la distribution des valeurs de distance entre les granules et la membrane plasmique exprimées comme un pourcentage du nombre total de granules détectés dans chaque image ($n = 30$ images). Les données montrent que l’inhibition de l’expression de Myrip réduit le nombre de granules près de la membrane plasmique (< 15 nm ou entre 15 et 50nm et augmente le nombre de granules lointains (> 500 nm. $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$).

2.2.3 Myrip retient les vésicules de sécrétion dans le cortex d'actine grâce à son domaine C-terminal

Afin d'obtenir des informations sur la dynamique des granules de sécrétion dans la zone subplasmalemmale sans avoir à identifier les trajectoires individuelles de chaque granule, nous avons développé une technique basée sur la photo-activation permettant de mesurer le temps de résidence des vésicules dans le champ évanescent avec une analyse des données simple et rapide.

Les cellules BON ont été transfectées avec une construction codant pour une fusion de NPY et de la protéine fluorescente photo-convertible Dendra2. Le spectre d'émission de la Dendra2 peut être décalé du vert vers le rouge après une brève illumination aux UVs. Nous avons couplé une diode UV laser à 405nm à notre microscope à onde évanescente. On peut ainsi convertir le marquage vert des granules présents dans le champ évanescent d'un vert en un marquage rouge (voir [FIGURE 2.2.3](#) page suivante).



Avant / Après photoactivation

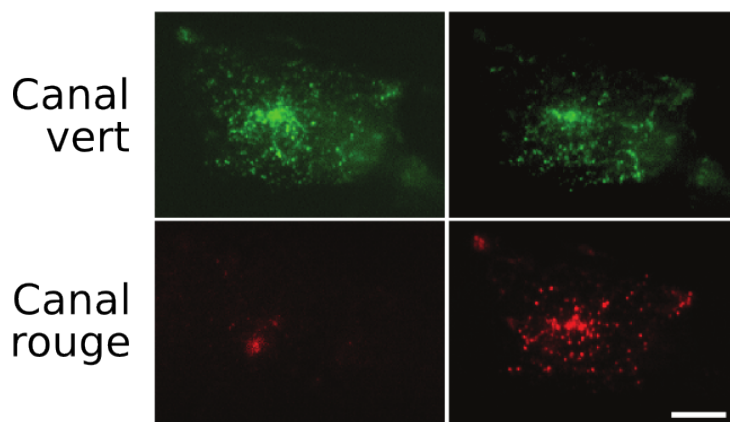


FIGURE 2.7 – **En haut**) Les cellules BON sont marquées avec NPY-Dendra2, une protéine de fusion entre le neuropéptide-Y et la Dendra2. Les cellules sont ensuite illuminées par onde évanescente avec une diode laser à 405nm. Les granules proches de la membrane plasmique sont alors photoconvertis et émettent dans le rouge. La dynamique du signal rouge sera liée à la rétention de ces granules rouges dans la région subplasmalemmale. **En bas**) Exemple de photo-activation d'une cellule BON. Avant (à gauche) et après (à droite) une illumination de 2 secondes à 405nm.

On peut alors mesurer l'intensité du signal rouge au cours du temps. Les granules convertis sont ceux qui sont les plus proches de la membrane plasmique. L'intensité de la fluorescence dans le canal rouge est corrélée à la quantité de granules à proximité de la membrane plasmique. Après un certain temps d'immobilisation, ils s'éloignent de la membrane plasmique. Dû à la décroissance exponentielle de l'intensité du champ d'évanescence, cet éloignement sera accompagné d'une diminution de l'intensité d'excitation, et donc de l'intensité de l'émission. En parallèle, des granules non marqués en rouge venant du centre de la cellule vont s'arrimer à la membrane et prendre la place des granules marqués en rouge. Ce phénomène va mener à une baisse de l'intensité de la fluorescence dans le canal rouge. La décroissance du signal aura un temps caractéristique représentatif du temps de résidence des granules de sécrétion dans le champ évanescent. On peut également segmenter les images afin de compter le nombre de granules de sécrétion présents à proximité de la membrane plasmique. Cette information est complémentaire de celle de l'intensité. Par exemple, pour une même décroissance d'intensité, un nombre inférieur de granules révélera une distance plus faible avec la membrane plasmique.

En accord avec l'effet de Myrip sur la densité des granules dans le champ évanescent (voir FIGURE 2.2.2 page 103, D), l'intensité intégrée initiale dans le canal rouge immédiatement après photo-activation est supérieure dans les cellules qui sur-expriment Myrip-FL par rapport au contrôle. En revanche, cette augmentation n'apparaît pas dans les cellules sur-exprimant Myrip- Δ C. Cette valeur diminue lorsqu'on inhibe l'expression de Myrip.

Au cours du temps, le nombre de granules détectés et le signal de fluores-

cence rouge diminuent (voir FIGURE 2.2.3). La sur-expression de Myrip-FL ralentit la décroissance du signal et du nombre de granules, alors que l'inhibition de l'expression de Myrip l'accélère. Myrip favorise donc la rétention des granules dans la zone subplasmalemmale. De plus, la sur-expression de Myrip- Δ C réduit la vitesse de disparition des granules, mais accélère la décroissance du signal rouge, suggérant que cette construction augmente la distance entre les granules et la membrane plasmique, mais les conserve à la périphérie de la cellule.

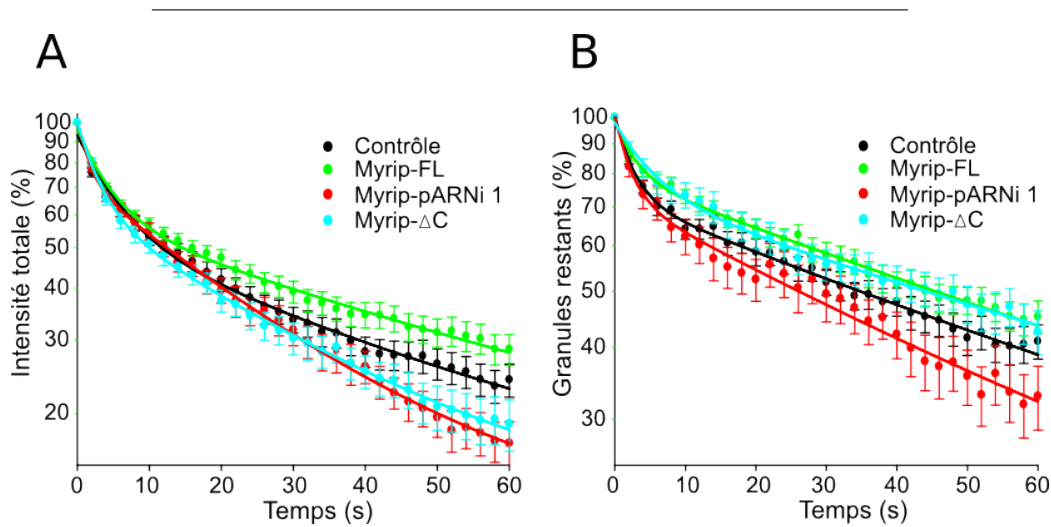


FIGURE 2.8 – **À gauche**) Intensité totale moyenne (\pm erreur standard) pour 100 μ m du signal rouge de fluorescence exprimée en pourcentage du signal juste après la photo-conversion ($n = 47$ cellules contrôles, $n = 16$ cellules Myrip-pARNi, $n = 57$ cellules sur-exprimant Myrip-FL, et $n = 31$ cellules sur-exprimant Myrip- Δ C). **À droite**) Nombre de granules présents dans la zone d'évanescence et visibles dans le canal rouge exprimé en pourcentage du nombre initial. Les courbes ont été ajustées avec une double exponentielle. L'ajustement obtenu pour le contrôle montre une différence significative avec les conditions Myrip-FL ($p = 0,0039$; somme des carrés F-test), Myrip-pARNi ($p = 0,0001$), et Myrip- Δ C ($p = 0,0001$).

Myrip participe donc à la rétention des granules dans la zone subplasmalemmale. Afin d'identifier le rôle de Myrip dans la dynamique des granules, nous avons étudié l'effet de Myrip sur les trajectoires individuelles des granules.

2.2.4 Myrip intervient dans la dynamique des granules de la sécrétion, des microtubules jusqu'à l'arrimage à la membrane plasmique

Afin de caractériser le comportement des granules de sécrétion, nous avons enregistré des films des granules marqués par NPY-GFP et observés par microscopie à onde évanescente. Les granules peuvent être alors identifiés et suivis au cours du temps par le logiciel MIA. On peut alors extraire les trajectoires dans le plan (x,y) et calculer le coefficient de diffusion latérale D_{xy} (voir FIGURE 2.2.4 page 114). Ce coefficient de diffusion est obtenu à partir du calcul du déplacement carré moyen (MSD, mean square displacement) qui est une fonction du temps, donnant le déplacement au carré moyen parcouru par un granule en un temps donné. On peut calculer à partir de la pente du MSD le D_{xy}) (pour plus de détails, voir section 3.4.3 page 203).

L'inhibition de l'expression de Myrip favorise les mouvements rapides le long des microtubules

Lorsqu'on inhibe l'expression de Myrip dans les cellules BON, le coefficient de diffusion latérale moyen D_{xy} calculé sur les trajectoires entières augmente significativement ($p = 0,007$), révélant une augmentation de la mobilité des granules de sécrétion.

Condition	D_{xy} ($10^{-4}\mu\text{m}^2/\text{s}$)	Erreur standard	N
Contrôle	24,3	$\pm 5,2$	653 / 10
Myrip-pARNi	92,3	$\pm 7,2$	761 / 10

(N indique le nombre de trajectoires / le nombre de cellules)

La distribution des D_{xy} moyens des différentes trajectoires révèle deux effets majeurs de Myrip (voir FIGURE 2.2.4 page 114) : une forte augmentation du pourcentage des granules ayant une forte mobilité ($D_{xy} > 50 \cdot 10^{-4}\mu\text{m}^2/\text{s}$) et une diminution du pourcentage de granules quasi-immobiles ($D_{xy} < 5 \cdot 10^{-4}\mu\text{m}^2/\text{s}$).

Afin d'analyser l'influence de Myrip en détail, nous avons extrait des trajectoires des granules les sections de trajectoires montrant un comportement

dirigé et des coefficients de diffusion instantanés $D_{xy} > 50 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$. Ce type de mouvement est fortement réduit par le traitement des cellules avec du nocodazole, une drogue qui dépolymérise les microtubules, révélant que ces mouvements sont caractéristiques des mouvements des granules le long des microtubules [Desnos et al., 2007b]. La proportion des trajectoires caractéristique des mouvements sur les microtubules (prop.), la vitesse des granules (vél.) au cours de ces trajectoires, et la longueur de ces trajectoires (dist.) augmentent significativement lors de l'inhibition de l'expression de Myrip.

Condition	prop.	ES	vél. ($\mu\text{m}/\text{s}$)	ES	dist. (μm)	ES
Contrôle	3,8	$\pm 0,4\%$	0,39	$\pm 0,02$	1,15	0,06
Myrip-pARNi	11,5	$\pm 1,5\%$	0,63	$\pm 0,03$	1,49	0,11
	$p = 0,002$		$p = 0,0002$		$p = 0,04$	

(N identique, voir tableau précédent ; ES : erreur standard)

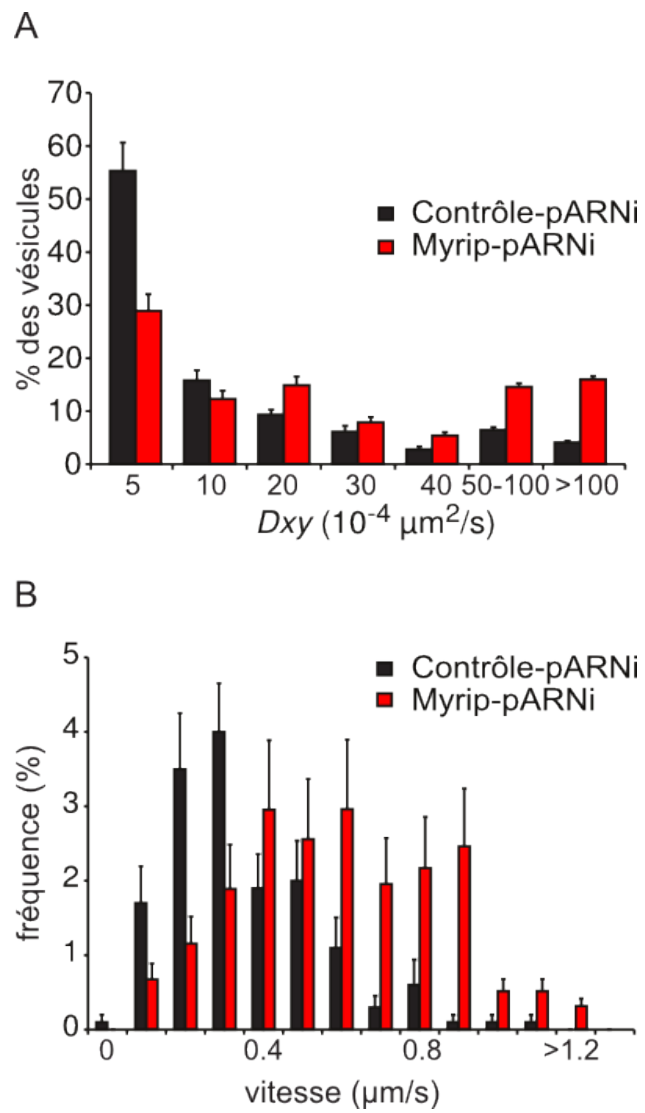


FIGURE 2.9 – Des granules individuels ont été suivis par microscopie à onde évanescente dans des cellules BON sur-exprimant NPY-GFP traitées avec un duplex pARNi contrôle (noir) ou dirigé contrôle Myrip (rouge). **A)** Distribution des D_{xy} moyens calculés sur les trajectoires entières ($n = 10$ cellules de 2 expériences indépendantes ; contrôle, 761 trajectoires ; Myrip-pARNi, 653 trajectoires). L'inhibition de l'expression de Myrip diminue significativement le nombre de granules immobiles $D_{xy} < 5 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$, probablement attachés à la membrane plasmique et augmente significativement le nombre de granules très mobiles $D_{xy} > 50 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ se déplaçant probablement sur les microtubules. **B)** Distribution des vitesses des granules de sécrétion dans les cellules contrôles (noir, $n = 10$ cellules, 155 sections dirigées) ou dans les cellules traitées avec un duplex pARNi contre Myrip (rouge, $n = 10$, 250 sections dirigées) sur les sections de trajectoires dirigées isolées. Cette distribution est décalée vers les hautes valeurs lors de l'inhibition de l'expression de Myrip.

Myrip semble donc interférer avec les mouvements des granules le long des microtubules. Cependant, Myrip joue également un rôle sur les granules immobiles.

Les périodes d'immobilisation des granules correspondent à l'arrimage à la membrane plasmique.

La trajectoire des granules de sécrétion révèle des périodes transitoires d'immobilités ayant un coefficient de diffusion moyen de $10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$, contre $25 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ pour les sections diffusives. De nombreux groupes ont proposé que ces périodes d'immobilisation soient caractéristiques de l'arrimage à la membrane plasmique [Huet et al., 2006, Desnos et al., 2007b, Nofal et al., 2007, Karatekin et al., 2008, Yizhar and Ashery, 2008, Ostrowski et al., 2010]. Nous avons étudié l'influence de Myrip sur ces périodes d'immobilisation. Pour suivre les variations transitoires de mobilité des granules, nous avons déterminé des coefficients de diffusion latéraux D_{xy} instantanés, en utilisant une méthode de fenêtre glissante (pour plus de détails voir section 3.4.3 page 203).

Les granules sont considérés comme immobiles lorsque le coefficient de diffusion instantané D_{xy} passe sous le seuil de $5 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (voir FIGURE 2.2.4

page ci-contre), car 95% des granules de sécrétion ont une mobilité inférieure à ce seuil pendant les 2 secondes précédant la fusion, période pendant laquelle les granules sont probablement arrimés [Desnos et al., 2007b]. Du fait de la nature stochastique du mouvement de diffusion brownien, une trajectoire purement diffusive peut contenir des périodes pendant lesquelles le coefficient de diffusion passe sous le seuil de $5 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$. Nous avons déterminé que l'observation de périodes d'immobilisation de 5 secondes ou plus est 100 fois plus probable chez des granules de sécrétion que pour des billes diffusant dans un mélange d'eau/glycérol et dont le D_{xy} moyen est similaire à celui des granules de sécrétion. Ainsi, si on impose comme critère que les granules doivent être immobiles 5 secondes ou plus pour être pris en compte, le nombre de faux positifs dus à des mouvements diffusifs est inférieur à 1% (voir plus de détails [Huet et al., 2012]).

L'ajustement du MSD des trajectoires permet de déterminer le paramètre d'anomalie α . Compris entre 0 et 1, α est d'autant plus petit que la trajectoire est contrainte. Les périodes d'immobilisation supérieures à 5 secondes montrent un $\alpha \simeq 0,4$, contre $\alpha \simeq 0,8$ en dehors de ces périodes. Ceci suggère que les granules immobiles sont attachés à une structure et non en train de diffuser très lentement. Ceci confirme l'idée que ces immobilisations pourraient être un arrimage à la membrane plasmique (pour plus de détails [Huet et al., 2012]).

Pour finir, nous avons utilisé le profil d'intensité de l'onde évanescente qui décroît exponentiellement avec la distance à l'interface pour déterminer les variations d'altitude des granules de sécrétion. Plus un granule est près de l'interface, plus l'intensité de l'excitation est importante, plus l'émission de fluorescence est importante. Nous avons donc déterminé la différence d'altitude de périodes d'immobilisation successives (voir FIGURE 2.2.4 page suivante). Deux informations intéressantes se dégagent de cette observation : (i) entre deux périodes d'immobilisation successives, les granules ne se rapprochent jamais de la membrane plasmique, mais s'en éloignent très légèrement systématiquement ; (ii) la plupart des différences d'altitudes sont inférieures à 20nm, ce qui correspond à la résolution de notre microscope. Ce résultat suggère que les granules se trouvent à la même altitude. L'hypothèse la plus

probable est que cette altitude est celle de la membrane plasmique. La différence d'altitude qui peut être observée entre deux périodes d'immobilisation successives est très probablement due au photo-blanchiment du NPY-GFP contenu dans les granules de sécrétion qui provoque une dérive apparente vers les altitudes les plus hautes.

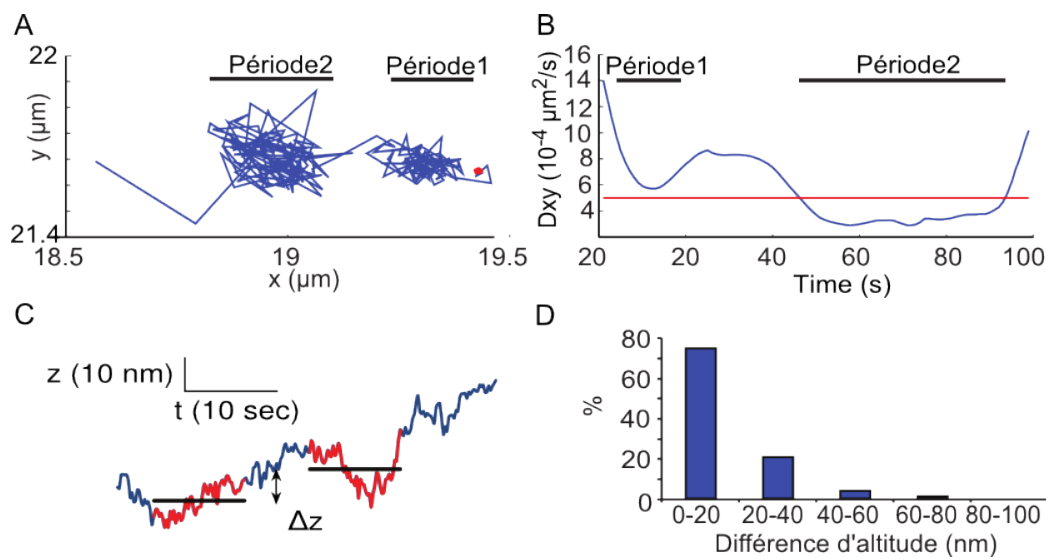


FIGURE 2.10 – **A,B**) Exemple de détection de période d'immobilisation. La trajectoire dans le plan (x,y) d'un granule de sécrétion est montrée en **A**. Le point rouge marque le point initial de la trajectoire. Les coefficients de diffusion latérale instantanés sont calculés sur cette trajectoire avec une méthode de fenêtre glissante et représentés en fonction du temps en **B**. Lorsque le coefficient de diffusion latérale instantané passe sous le seuil de $D_{xy} < 5 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (ligne rouge), les granules sont considérés comme immobiles. Dans cet exemple, la trajectoire fait apparaître deux sections de mouvements contraints, mais seule la période 2 est considérée comme immobile. **C**) Exemple d'une trajectoire suivant l'altitude (axe z) d'un granule de sécrétion. Les zones représentées en rouge correspondent à des périodes d'immobilisation dans le plan (x,y) . Les traits horizontaux représentent l'altitude moyenne au cours de ces périodes d'immobilisation. **D**) Histogramme de la distribution des différences d'altitudes entre deux périodes d'immobilisation successives, mesurées dans 114 trajectoires de 7 cellules.

L'inhibition de l'expression de Myrip interfère avec l'arrimage à la membrane plasmique

Afin d'analyser ces périodes d'immobilisation, on étudie la courbe de survie des périodes d'immobilisation en fonction du temps (voir FIGURE 2.2.4). Cette courbe peut être ajustée par une double exponentielle, révélant deux types d'immobilisations dans chaque cellule : des périodes courtes de temps caractéristique ~ 4 s, et des périodes longues de temps caractéristique ~ 15 s. Les périodes courtes sont probablement contaminées par des faux positifs provenant des mouvements diffusifs, mais pas les périodes longues. Ces périodes sont donc utilisées comme critère d'attachement à la membrane plasmique.

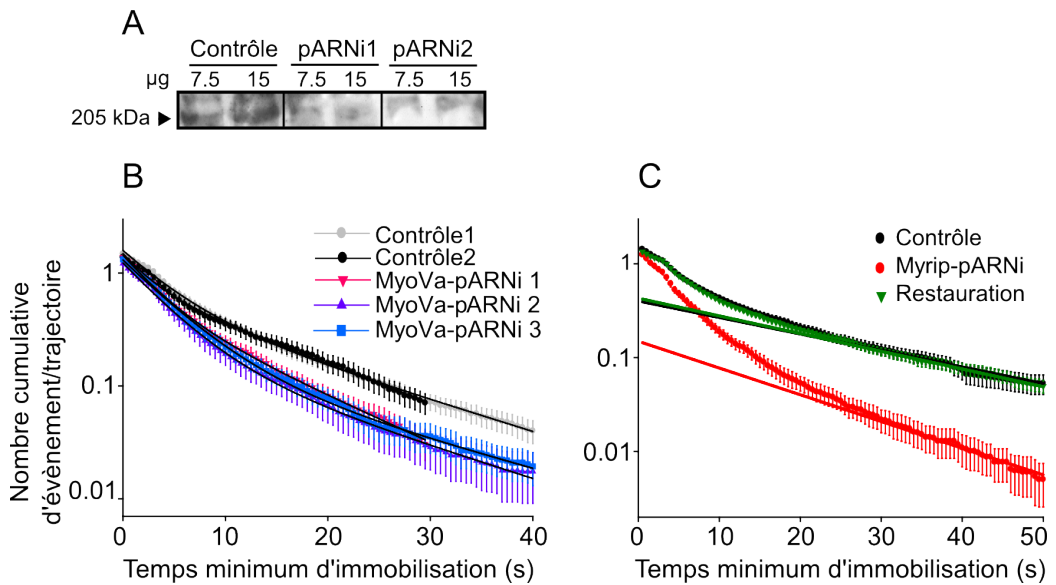


FIGURE 2.11 – **A)** Inhibition de l’expression de la Myosine Va (MyoVa). Trois jours après transfection de duplex pARNi contrôle, MyoVa-pARNi2, MyoVa-pARNi3, les niveaux d’expression sont analysés par immuno-transfert. Ici, une membrane de transfert typique. Pour MyoVa-pARNi1, voir [Desnos et al., 2007b]. **B)** La Myosine Va diminue la fréquence mais pas la durée des périodes d’arrimage à la membrane plasmique. Des cellules BON ont été transfectées avec NPY-GFP et un duplex pARNi contre la MyoVa et observée en imagerie à onde évanescente ($n = 32$ cellules contrôle, $n = 19$ cellules MyoVa-pARNi, $n = 11$ cellules MyoVa-pARNi2, et $n = 12$ cellules MyoVa-pARNi3 issues de 3 expériences indépendantes, avec 1500 à 4000 trajectoires par condition). Les périodes immobilisées ont été détectées comme décrit dans la FIGURE 2.2.4 page 117. Représenté ici, le logarithme de la distribution cumulée du nombre de périodes d’immobilisation en fonction de leur durée. La durée moyenne est de ~ 16 s dans les cellules contrôle, et ~ 13 s dans les cellules traitées par MyoVa-pARNi. **C)** L’inhibition de l’expression de Myrip diminue la fréquence des périodes d’immobilisation et leur durée (idem que **B)** mais avec l’inhibition de l’expression de Myrip ; $n = 32$ cellules contrôle, $n = 30$ cellules Myrip-pARNi et $n = 20$ cellules restauration issues de 2–4 expériences indépendantes, avec 2500 à 3000 trajectoires par condition). La pente et l’ordonnée à l’origine sont affectées par l’inhibition de l’expression de Myrip. La durée moyenne des périodes d’immobilisation dans les cellules contrôle est de ~ 18 s, de ~ 12 s dans les cellules traitées par Myrip-pARNi, et de ~ 16 s dans les cellules restaurées.

Il a été montré que la Myosine Va favorise l’attachement à la membrane plasmique [Desnos et al., 2007b]. L’inhibition de l’expression de la Myosine Va avec trois pARNi différents diminue la fréquence des périodes d’immobilisation mais pas leur temps caractéristique τ_2 . La Myosine Va permet donc le recrutement à la membrane plasmique, mais ne stabilise pas l’arrimage. L’inhibition de l’expression de Myrip diminue la fréquence des périodes d’immobilisation, mais également le temps caractéristique τ_2 (voir FIGURE 2.2.4 page suivante). Le phénotype peut être restauré par sur-expression d’un mutant de Myrip résistant au duplex. Ces données, ainsi que les effets de l’inhibition de l’expression de Myrip sur la densité des granules observés en imagerie à onde évanescente et sur la proximité des granules de sécrétion à la membrane plasmique observée par microscopie électronique, suggèrent que Myrip participe au recrutement à la membrane plasmique des granules de sécrétion, et

à l'arrimage à la membrane plasmique.

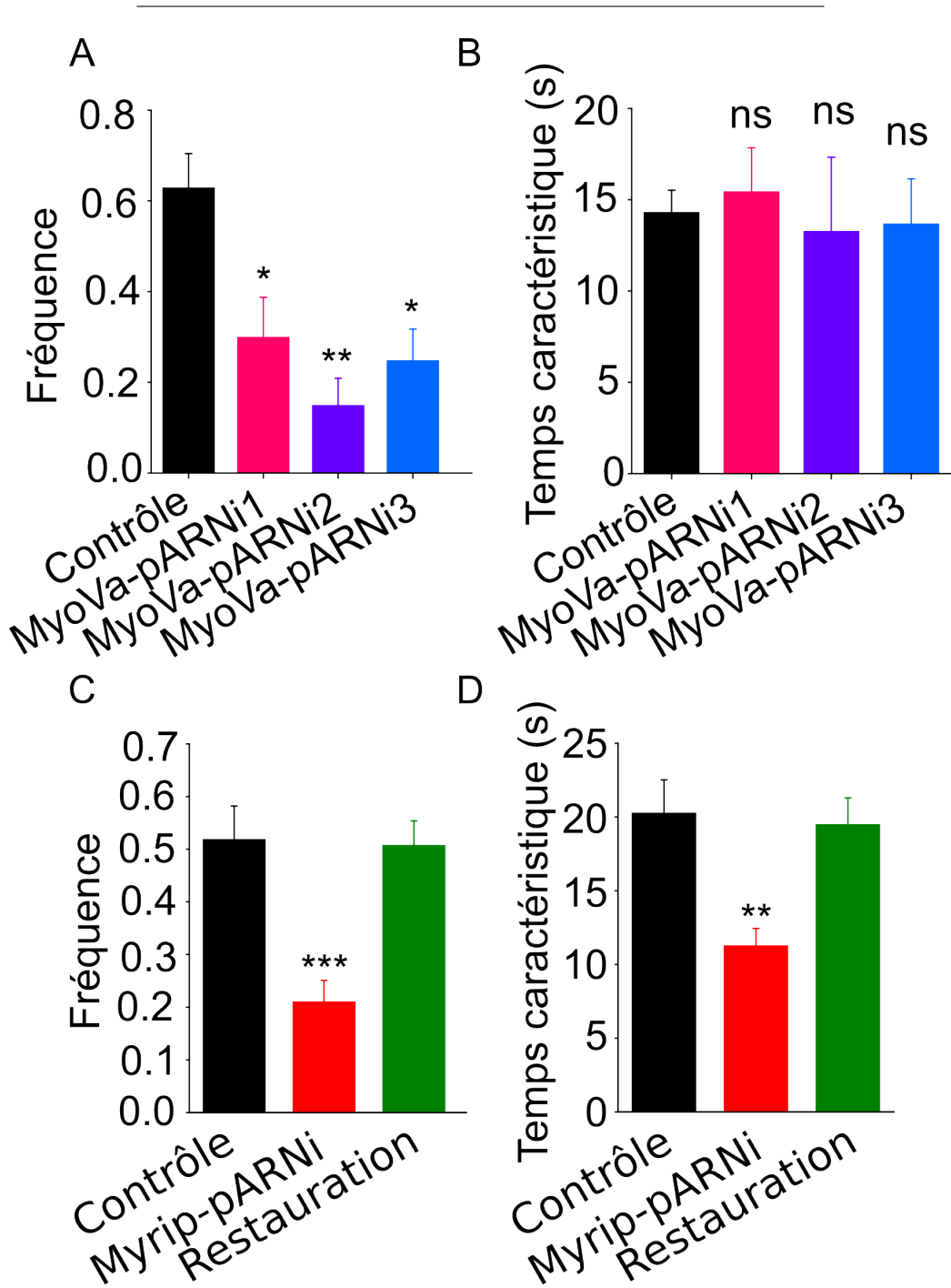


FIGURE 2.12 – Les histogrammes montrent les valeurs moyennes (\pm erreur standard) de la fréquence (*i.e.* l'ordonnée à l'origine de la droite ajustée) calculées pour chaque cellule puis moyennées sur l'ensemble des cellules, ainsi que les temps caractéristiques d'immobilisation (composante lente). $p = 0,0006$ (MyoVa, fréquence), $p = 0,98$ (MyoVa, temps caractéristique), $p < 0,0001$ (Myrip, fréquence), et $p = 0,0017$ (Myrip, temps caractéristique, test de Kruskal-Wallis). Les astérisques indiquent le résultat du post-test de Dunn. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.

Myrip semble donc avoir un effet spécifique au delà du recrutement de la Myosine Va. Afin d'examiner cet effet, nous avons analysé l'effet des différentes constructions tronquées de Myrip sur l'arrimage des granules de sécrétion à la membrane plasmique (voir FIGURE 2.2.4 page suivante). Myrip- Δ C peut interagir avec la Myosine Va, mais ne possède pas le domaine C-terminal, alors que Myrip-RBD ne recrute pas la Myosine Va. La sur-expression de Myrip-RBD et de Myrip- Δ C augmente le coefficient de diffusion moyen D_{xy} , et réduit la proportion de granules ayant un faible coefficient de diffusion ($D_{xy} < 5 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$) de $\sim 35\%$ par rapport au contrôle ou aux cellules sur-exprimant Myrip-FL ($p < 0,0001$, ANOVA). Myrip-RBD et Myrip- Δ C réduisent aussi la fréquence des périodes d'immobilisation prolongée de 53% et 27% respectivement. De plus, Myrip- Δ C diminue le temps caractéristique d'immobilisation comparé à Myrip-FL ($p = 0,0004$), suggérant que le domaine C-terminal de Myrip stabilise l'attachement à la membrane.

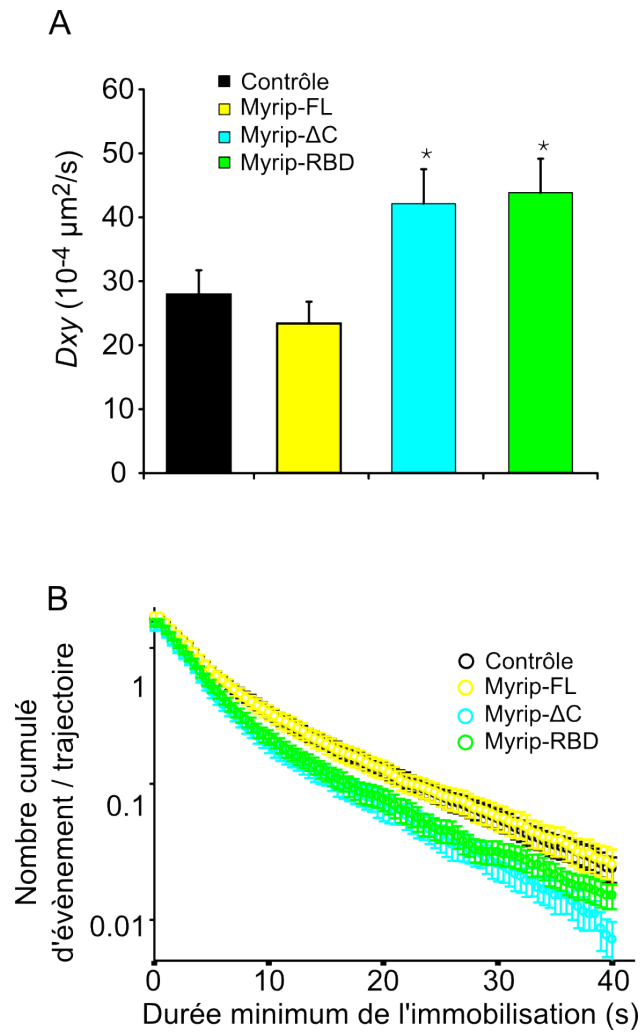


FIGURE 2.13 – **A)** Effet des constructions de Myrip sur la mobilité des granules. Des cellules BON ont été transfectées avec NPY-GFP et Myrip-RBD, Myrip-FL, ou Myrip- Δ C et observées par imagerie à onde évanescente. Les trajectoires des granules ont été suivies, et les coefficients de diffusion D_{xy} ont été quantifiés sur les trajectoires complètes. Représentées ici, les moyennes (\pm erreur standard) des valeurs obtenues ($n = 34$ cellules contrôle issues de 3 expériences; $n = 30$ cellules sur-exprimant les constructions Myrip issues de 3 expériences). $p = 0,001$ (test de Kurskal-Wallis). **B)** Les constructions tronquées de Myrip réduisent l’immobilisation longue des granules de sécrétion. Une analyse par fenêtre glissante a permis de déterminer les D_{xy} instantanés des trajectoires des granules et les périodes d’immobilisation ($D_{xy} < 5 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$). Représenté ici, le logarithme de la distribution cumulée du nombre d’évènements d’immobilisation en fonction de leur durée. La fréquence des évènements d’immobilisation longs est plus basse dans les cellules sur-exprimant Myrip-RBD ou Myrip- Δ C que dans les cellules contrôle ou sur-exprimant Myrip-FL ($p < 0,0002$, test F de la somme des carrés). La pente de la composante longue des périodes d’immobilisation est plus grande dans les cellules sur-exprimant Myrip- Δ C que dans celles sur-exprimant Myrip-FL ($p = 0,0004$). $*p < 0,05$.

Myrip limite la mobilité des granules de sécrétion dans le cortex d’actine.

Nous avons également étudié l’effet de Myrip sur les sections trajectoires des granules de sécrétion ni immobiles ni dirigées. Pendant ces sections, les trajectoires montrent un mouvement diffusif brownien, les granules de sécrétion diffusent donc avec ou dans le cortex d’actine [Huet et al., 2006]. L’inhibition de l’expression de la Myosine Va ou de Myrip augmente la proportion de temps passé par les granules dans ces périodes diffusives, ainsi que la mobilité des granules pendant ces périodes.

Condition	D_{xy} ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	Erreur Standard
Contrôle	14,9	$\pm 1,9$
Myrip-pARNi	22,6	$\pm 1,3$
$N = 10$ cellules, $p = 0,01$		
Contrôle	14,0	$\pm 1,5$
MyoVa-pARNi	24,5	$\pm 2,9$
$N = 16$ cellules, $p = 0,003$		

Ces résultats suggèrent que le complexe Rab27a / Myrip / Myosine Va limite les mouvements des granules dans le cortex d'actine, probablement en se liant à l'actine, afin de maintenir les granules à proximité des sites de fusion.

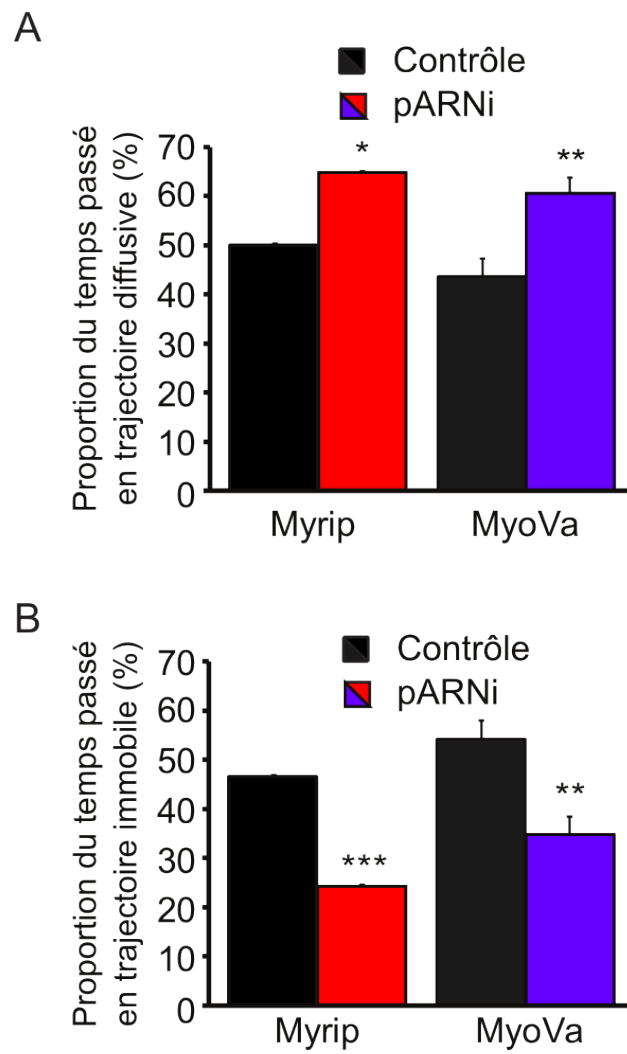


FIGURE 2.14 – Des cellules BON ont été transfectées avec des duplex pARNi (contrôle, noir ; Myrip-pARNi, rouge ; MyoVa-pARNi, violet) et pNPY-GFP et observées par imagerie à onde évanescence. Le coefficient de diffusion D_{xy} a été calculé sur des trajectoires individuelles. Les sections correspondant aux mouvements dirigés (identifiés manuellement) ou les périodes d'immobilisation ($D_{xy} < 5 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ pour une durée supérieure à 6–8,5s suivant les conditions) ont été retirées. Les périodes restantes ont été analysées et considérées comme diffusives. **A,B**) Proportion du temps passé en période diffusive (**A**) ou immobile (**B**) par les granules de sécrétion issus de cellules contrôle, ou traitées avec un duplex Myrip-pARNi, ou MyoVa-pARNi (10–20 cellules par condition). La durée moyenne des trajectoires est de $\sim 17\text{s}$ dans les cellules contrôle, 14s dans les cellules MyoVa-pARNi, et 10s dans les cellules Myrip-pARNi. $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$.

2.3 Discussion

2.3.1 Myrip recrute la Myosine Va permettant la rétention dans la zone périphérique

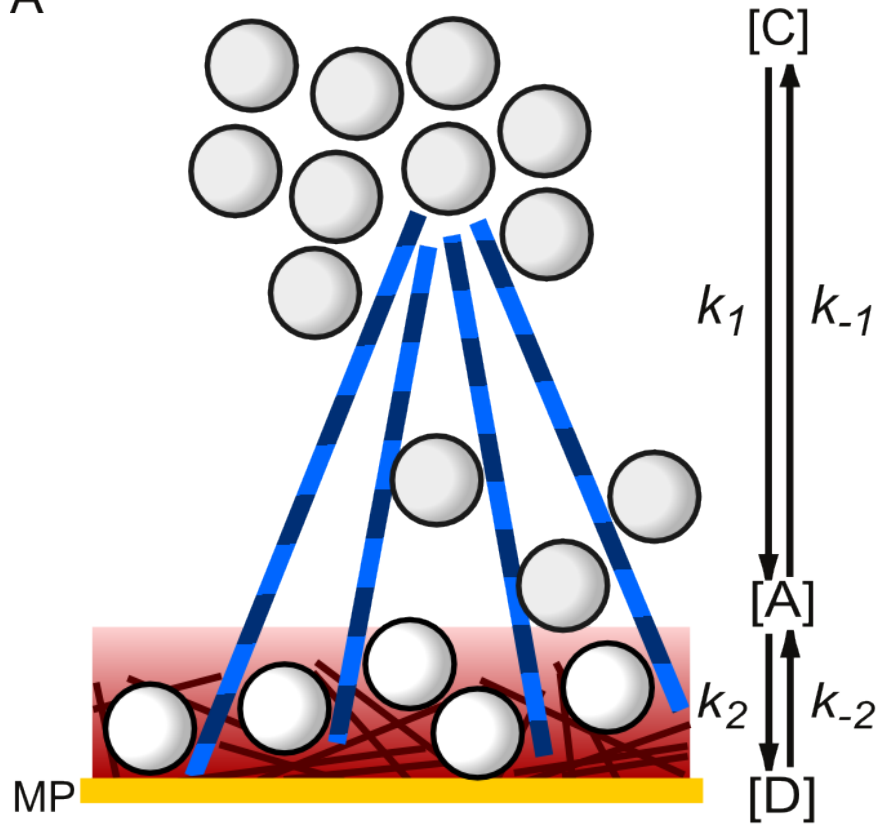
Au cours des 10 dernières années, il a été montré au laboratoire que Myrip était recruté par Rab27a et limitait la mobilité des granules à proximité de la membrane plasmique, probablement dans le cortex d'actine [Desnos et al., 2003]. Il a également été montré que la Myosine Va est recrutée sur les granules de sécrétion et permet la séquestration des granules de sécrétion à la périphérie de la cellule [Desnos et al., 2007b]. Myrip interagit avec la Myosine Va *in vitro*. Nous avons montré que Myrip recrute la Myosine Va sur les granules de sécrétion dans les cellules (voir section 2.2.1 page 99). De plus, l'inhibition de l'expression de Myrip provoque une ségrégation péri-nucléaire des granules de sécrétion similaire à celle qui est obtenue lors de l'inhibition de l'expression de la Myosine Va [Desnos et al., 2007b], ainsi que l'augmentation de la distance des granules à la membrane plasmique observés en microscopie électronique. Nous avons également mis au point une technique de photo-activation qui révèle que le temps de rétention à la périphérie de la cellule est supérieur lors de la sur-expression de Myrip-FL

par rapport aux contrôles, et inférieure lors de l'inhibition de l'expression de Myrip. De plus, l'analyse des données de photo-activation et de la mobilité des granules sécrétion suggèrent que Myrip, en particulier son domaine C-terminal, participe directement à l'arrimage des granules de sécrétion. Ces données indiquent que Myrip joue un rôle important dans la rétention des granules à la périphérie.

2.3.2 Modélisation du trafic des granules de sécrétion dans la cellule

Myrip intervient donc dans le trafic des granules à proximité de la membrane plasmique. Afin d'analyser le rôle de Myrip dans le trafic, nous avons mis au point un modèle par compartiments des mouvements des granules. Dans ce modèle, nous définissons trois compartiments basés sur les trois types de trajectoire des granules de sécrétion observés (dirigées, diffusives, immobiles). Nous supposons que les granules sont transportés depuis le centre de la cellule vers la périphérie sur les microtubules (C) puis entrent dans le cortex d'actine (A), et diffusent jusqu'à trouver un site d'arrimage à la membrane plasmique (D) (voir [FIGURE 2.3.2](#) page suivante). La transition C→D n'est pas permise : les granules ne peuvent pas aller du centre de la cellule directement à la membrane plasmique, sans passer par une phase de diffusion dans le cortex d'actine [[Huet et al., 2006](#)].

A



B

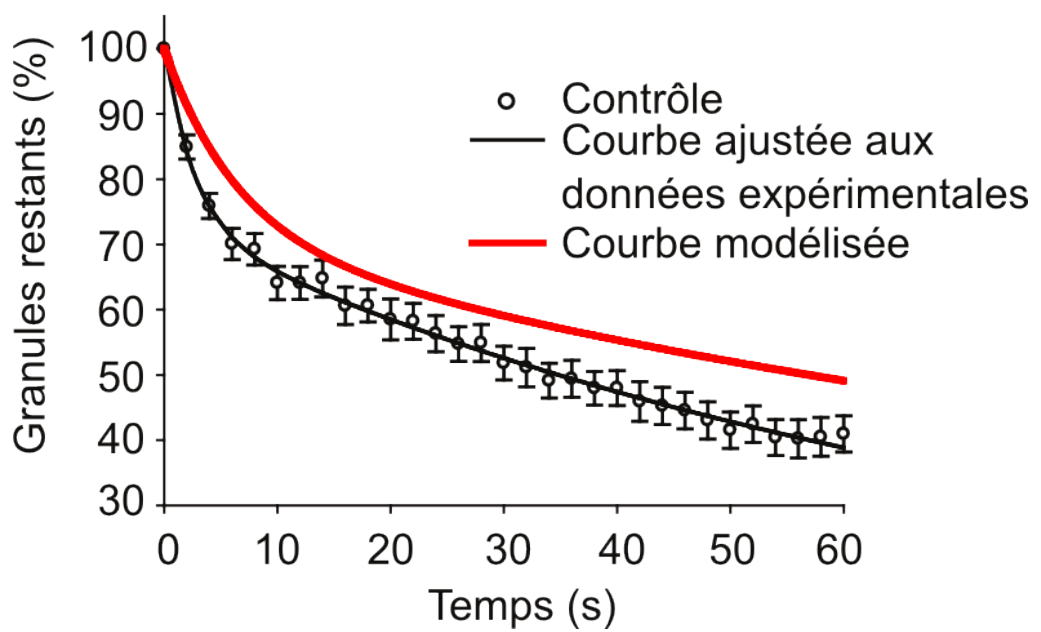


FIGURE 2.15 – **A**) Des granules de sécrétion peuvent être attachés à la membrane plasmique (PM) (D) ou localisés dans le cortex d’actine dans la zone subplasmalemmale (A) ou au centre de la cellule (C). Les lignes bleues représentent les microtubules qui permettent le transport des granules vers la périphérie de la cellule. Les lignes rouges représentent le cortex d’actine. Les transitions entre les états C, A et D sont gouvernées par les constantes k_1 , k_{-1} , k_2 , k_{-2} . En accord avec les résultats de [Huet et al., 2006], la transition entre C et D est interdite : les granules de sécrétion doivent se dissocier des microtubules et diffuser dans le cortex d’actine pour s’arrimer à la membrane plasmique. Étant donné que le temps caractéristique de résidence à la périphérie A+D (~ 60 s) est plus long que la somme des temps de résidence dans A (~ 15 s) et dans D (~ 15 s), on peut conclure que les granules de sécrétion peuvent avoir plusieurs phases de diffusion locale dans l’actine et d’immobilisation à la membrane plasmique avant de retourner vers le centre de la cellule. **B**) Simulation de l’expérience de photo-activation. Il est montré ici la comparaison entre l’expérience de photo-conversion (contrôle de la FIGURE 2.2.3 page 111 ajustés avec une double exponentielle; ligne noire) et une simulation (rouge) basée sur le modèle montré en **A**. La composante rapide reflète l’équilibration entre D et A. La composante lente représente le départ des granules de sécrétion du cortex d’actine.

L’analyse des données de Myrip, et les trajectoires des granules individuelles permettent le calcul des différentes constantes du modèle (voir plus de détails dans [Huet et al., 2012] en annexe).

	Contrôle pARNi	MyoVa pARNi 1	Myrip pARNi
Densité ($\text{GS}\mu\text{m}^{-2}$)	$0,44\pm 0,038$	$0,23\pm 0,023^{**}$	$0,35\pm 0,032$
Arrimés (%)	$50,7\pm 3,1$	$35,6\pm 3,7^{**}$	$24,4\pm 2,4^{***}$
D ($\text{GS}\mu\text{m}^{-2}$)	$0,22\pm 0,025$	$0,08\pm 0,013^{***}$	$0,08\pm 0,011^{**}$
A ($\text{GS}\mu\text{m}^{-2}$)	$0,22\pm 0,025$	$0,15\pm 0,016$	$0,26\pm 0,028$
$k_2(\text{s}^{-1})$	$0,082\pm 0,012$	$0,045\pm 0,012^*$	$0,040\pm 0,0006^*$
$k_{-2}(\text{s}^{-1})$	$0,056\pm 0,004$	$0,064\pm 0,01$	$0,088\pm 0,009^{***}$
$k_{-1}(\text{s}^{-1})$	$0,016\pm 0,002$	$0,022\pm 0,002^{**}$	$0,036\pm 0,005^{**}$
$k_1C(\text{GS}\mu\text{m}^{-2}\text{s}^{-1})$	$0,0033\pm 0,001$	$0,0027\pm 0,0002$	$0,0087\pm 0,001^{**}$
N (cellules)	22	12	10

2.3.3 Myrip arrache les granules des micro-tubules

Le transfert des granules des microtubules vers le cortex d'actine pourrait se faire de deux façons différentes : la première serait que les granules soient transportés jusqu'à la zone périphérique par une kinésine sur un microtubule, puis s'en décrochent, diffusent dans le cytosol jusqu'au cortex d'actine et y soient alors recrutés par l'interaction du complexe Rab27a / Myrip / Myosine Va. L'autre possibilité est que les granules soient transportés jusqu'au cortex d'actine sur un microtubule et soient arrachés par Myrip et séquestrés dans l'actine.

L'inhibition de l'expression de Myrip diminue la durée, la distance et la vitesse des mouvements dirigés caractéristiques des mouvements le long des microtubules, ainsi que la proportion du temps pendant lequel les granules adoptent ce type de mouvement. Ceci montre qu'il existe une compétition entre la rétention dans l'actine par Myrip et les mouvements le long des microtubules. Myrip arrache donc probablement les granules depuis les microtubules. La diminution de la vitesse des mouvements dirigés suggère même que les granules peuvent interagir à la fois avec les microtubules et l'actine.

2.3.4 Myrip séquestre les granules dans le cortex d'actine

L'inhibition de l'expression de Myrip comme celle de la Myosine Va diminue la constante de vitesse k_{-1} (transition $A \rightarrow C$) et augmente la mobilité des granules ayant un mouvement diffusif caractéristique du cortex d'actine. À l'inverse, la sur-expression de Myrip réduit le coefficient de diffusion des granules de sécrétion dans le cortex.

Il est surprenant que l'inhibition de l'expression de la Myosine Va augmente le coefficient de diffusion moyen des granules dans le cortex d'actine. La Myosine Va est un moteur processif, on aurait pu s'attendre à ce qu'elle augmente la mobilité des granules sur les filaments d'actine. Ceci amène à se demander à quel point les granules sont mobiles dans le cortex d'actine. Est-ce que le rôle de Myrip et de la Myosine Va est simplement de fixer les granules à l'actine? Le mouvement diffusif des granules serait alors principalement

contrôlé par la dynamique de l'actine et la polymérisation/dépolymérisation des filaments. Cependant, la Myosine Va pourrait avoir un réel rôle processif qui n'a pas encore été identifié, parce que transitoire ou le long de l'axe z. Afin de tester ces possibilités, il serait intéressant de mesurer le coefficient de diffusion de l'actine et de le comparer à celui des granules de sécrétion dans nos conditions expérimentales. Des études ont été réalisées afin de mesurer la mobilité de l'actine dans les cellules avec des techniques de récupération de la fluorescence après photo-blanchiment (FRAP). Elles montrent qu'il existe de l'actine très mobile ayant des coefficients de diffusion incompatibles avec le mouvement des granules ($10^{-7}\mu\text{m}^2/\text{s}$ – $10^{-9}\mu\text{m}^2/\text{s}$) mais également une population plus lente de filaments, dont le coefficient de diffusion n'a pas pu être déterminé mais qui pourrait être compatible avec le mouvement des granules [Wang et al., 1982, Wang, 1987]. Le coefficient de diffusion de certaines structures d'actines marquées par l'actine-GFP a été déterminée à $\sim 15 \cdot 10^{-4}\mu\text{m}^2/\text{s}$ ce qui est tout à fait compatible avec la mobilité des granules [Desnos et al., 2007b]. La photo-activation pourrait être utilisée pour mesurer précisément la vitesse de diffusion locale de l'actine (voir section 2.3.8 page 135). Afin de tester cette hypothèse, on pourrait aussi créer une protéine de fusion entre une molécule qui s'intègre aux filaments d'actine (Lifeact par exemple) et une protéine membranaire des granules de sécrétion (la Synaptotagmine ou la Synaptobrevine par exemple). Ceci permettrait d'ancrer les granules de sécrétion dans les filaments d'actine. On pourrait ensuite suivre leurs mouvements en les marquant avec du NPY-GFP et comparer leur coefficient de diffusion avec un contrôle. Si le coefficient de diffusion est identique, cela indiquerait que les mouvements des granules est principalement déterminée par la dynamique du cytosquelette. Si les granules sont moins mobiles, cela suggérerait un rôle processif de la Myosine Va. Une autre façon de tester cette hypothèse serait par l'inhibition de l'expression de la Myosine Va endogène et la sur-expression d'un mutant non processif de la Myosine Va (comme celui utilisé par Hodges et al. [Hodges et al., 2009]), et l'étude de l'impact sur la mobilité des granules. S'il n'y a pas de différence avec les conditions contrôle, cela suggérerait que la processivité de la Myosine Va n'est pas essentielle pour sa fonction dans la rétention des granules

à la périphérie de la cellule et le recrutement vers les sites d'exocytose.

Il est aussi possible d'essayer de mettre en évidence des mouvements processifs de la Myosine Va en suivant les mouvements des granules suivant l'axe z en comparant des conditions contrôle et des conditions d'inhibition de l'expression de Myosine Va. Cependant, il est probable que les mouvements soient relativement courts (maximum de l'épaisseur du cortex d'actine) et donc difficilement mesurables.

Il est important de noter que la processivité de la Myosine Va dépend de la présence de calcium (voir section 2.1.3 page 95). Ces expériences devront donc être faites en conditions repos et en conditions stimulées pour être complètes.

2.3.5 Le paradoxe de Myrip

Si on suppose que la Myosine Va est processive, le rôle de Myrip et de son domaine C-terminal semble assez paradoxal. Myrip permet le recrutement d'un moteur processif qui avance le long de l'actine, mais possède un domaine d'interaction avec l'actine restreignant la possibilité de mouvements. La Myosine Va doit alors « traîner » Myrip pour avancer, ce qui ne semble pas favorable au premier abord.

Cependant, des données de la littérature suggèrent que la présence d'une protéine interagissant avec l'actine pourrait avoir un effet favorable sur la processivité de moteurs moléculaires. En effet, il a été montré que la présence d'une kinésine qui interagit avec l'actine améliore le transport d'un cargo par la Myosine V chez la levure [Hodges et al., 2009]; les auteurs proposent que cet effet soit dû à l'attachement du cargo à l'actine qui lui permet de rester sur le rail d'actine même si la Myosine se dissocie, permettant de faire des trajets plus longs. Myrip pourrait donc stabiliser le granule de sécrétion au filament d'actine sur lequel il évolue. Bien qu'*in vitro*, la Myosine V soit capable de parcourir de longues distances sur les filaments d'actine avant de se dissocier [Mehta et al., 1999], les conditions *in vivo*, avec un cargo de taille importante, transporté dans un réseau dense de filaments sont sans doute moins favorables. Pour tester ce modèle, il serait intéressant d'étudier

in vitro les effets de Myrip sur la vitesse de déplacement de la Myosine Va le long des filaments d'actine, ainsi que sa stabilité. Pour contraindre le système, on pourrait utiliser un milieu visqueux, une perfusion continue, ou encore lier la Myosine à une bille immobilisée dans un piège optique.

2.3.6 Rôle du domaine C-terminal de Myrip dans l'arrimage des granules de sécrétion

Myrip semble également jouer un rôle important et singulier dans l'arrimage à la membrane plasmique. En effet, l'inhibition de l'expression de la Myosine Va diminue le nombre de granules de sécrétion arrimés à la membrane plasmique et k_2 (la transition A→D), mais pas le temps caractéristique d'immobilisation et k_{-2} (la transition D→A); ce qui suggère que la Myosine Va permet de guider les granules vers les sites de fusion. L'inhibition de l'expression de Myrip produit un effet supplémentaire : la diminution du temps caractéristique d'immobilisation des granules à la membrane plasmique (k_{-2}). De plus, la sur-expression de Myrip entraîne un arrimage plus long à la membrane plasmique que la sur-expression de Myrip- Δ C. Ces résultats impliquent que le domaine C-terminal stabilise l'arrimage des granules de sécrétion à la membrane plasmique.

Ces données suggèrent plusieurs modèles :

(i) Le domaine C-terminal de Myrip pourrait s'ancrer directement à des sites spécifiques de l'actine proches de la membrane plasmique, et ainsi maintenir les granules de sécrétion à proximité de la membrane plasmique. Pour tester cette hypothèse, on pourrait sur-exprimer uniquement le domaine C-terminal de Myrip afin de titrer les sites de fixation de l'actine à la membrane. Si ce modèle est vrai, ceci devrait diminuer la stabilité de l'arrimage à la membrane des granules car Myrip endogène ne pourrait alors plus se fixer à ces sites. On pourrait également essayer de mettre en évidence des structures stables d'actine grâce à la photo-activation par le champ évanescent (voir section 2.3.8 page 135) d'une molécule comme Lifeact-Dendra2.

(ii) Le domaine C-terminal de Myrip pourrait agir via d'autres protéines. Ainsi, il a été montré que Myrip pouvait interagir avec le complexe Exo-

cyste (voir section 1.6.4 page 32) [Goehring et al., 2007] qui intervient dans l'arrimage à la membrane de différents organites, même si l'implication de l'Exocyste dans l'arrimage des granules de sécrétion n'a pas été démontré. Myrip pourrait permettre un premier contact à la membrane plasmique via l'Exocyste qui permettrait ensuite un l'arrimage via les protéines SNAREs. Cette série d'étapes pourrait expliquer le pas de 20nm qu'effectuent les granules vers la membrane plasmique avant la fusion [Karatekin et al., 2008]. Pour tester cette hypothèse, il serait d'abord nécessaire de mettre en évidence l'intervention de l'Exocyste dans l'arrimage à la membrane (des données préliminaires au laboratoire semblent l'indiquer). Une autre possibilité serait de mettre en place une expérience de transfert d'énergie par résonance de Förster (FRET), avec un donneur sur le domaine C-terminal de Myrip et un accepteur sur une des sous-unités de l'Exocyste, afin de montrer qu'il y a formation d'un complexe à la membrane plasmique. Enfin, on pourrait de muter le domaine C-terminal de Myrip pour créer un mutant capable de se lier à l'actine, mais pas à l'Exocyste. Cependant, tant que le complexe entre Myrip et l'Exocyste n'est pas cristallisé, il est difficile de savoir quels résidus pourraient être impliqués dans cet interaction.

(iii) Myrip stabilise la Myosine Va sur l'actine et favorise des trajets plus longs sur l'actine (voir section 2.3.5 page 132). Ceci augmente la probabilité d'arriver à l'extrémité d'un filament, et donc de se rapprocher de la membrane plasmique malgré les contraintes. Ceci permettrait de maintenir les granules à l'extrémité du filament, afin de permettre l'arrimage par l'Exocyste ou les protéines SNAREs.

2.3.7 Conclusion sur le rôle du complexe Rab27a / Myrip / Myosine Va

L'ensemble de ces données montrent qu'un complexe Rab27a / Myrip / Myosine Va se forme à la surface des granules. Ce complexe permet le recrutement des granules à la membrane plasmique et leur arrimage. La coopération de la Myosine Va et du domaine C-terminal de Myrip qui interagissent avec l'actine permet d'arracher les granules aux microtubules et de séquestrer les

granules dans l'actine. La Myosine Va permet de guider les granules vers les sites d'arrimage à la membrane plasmique où le domaine C-terminal de Myrip favorise l'arrimage à la membrane plasmique. Myrip permet donc le couplage de la rétention des granules à la périphérie de la cellule dans le cortex d'actine et l'arrimage à la membrane plasmique. Myrip apparaît donc comme un acteur essentiel du trafic des granules dans l'exocytose régulée.

2.3.8 La photo-activation permet un test rapide de la rétention à la membrane plasmique

La méthode de photo-activation que nous avons développée a été mise au point initialement pour permettre une mesure rapide de l'arrimage des granules à la membrane plasmique. L'analyse des trajectoires individuelles des granules est très lourde, car elle implique la segmentation des images, avec le suivi des trajectoires individuelles, le nettoyage de chaque trajectoire pour éviter les erreurs de détection automatique, puis l'exécution de routines d'analyses.

La photo-activation devait offrir une alternative rapide à cette méthode, impliquant un traitement rapide : l'analyse de la décroissance du signal aurait permis d'avoir accès à différents temps caractéristiques, dont celui d'arrimage à la membrane.

Cependant, l'ajustement des courbes de décroissance de l'intensité du signal rouge ne permet pas d'identifier de temps caractéristique de l'ordre de 15s compatible avec l'immobilisation des granules à la membrane. En revanche, la technique permet d'avoir accès au temps global de rétention dans la zone subplasmalemmale, dans le cortex d'actine et l'arrimage à la membrane (A+D), ce qui permet d'obtenir une information qui était difficilement accessible auparavant.

Nous avons modélisé une expérience de photo-activation à partir de notre modèle théorique, et avons obtenu une courbe proche des résultats expérimentaux (voir [FIGURE 2.3.2](#) page 128) (pour plus de détails sur la modélisation, voir [[Huet et al., 2012](#)] en annexe). Ceci confirme que l'observation du signal de la photo-activation permet d'avoir accès au temps de rétention à la

périphérie de la cellule.

On peut se demander si l'optimisation de la technique de photo-activation permettrait d'avoir accès au temps caractéristique d'arrimage à la membrane plasmique. Cela semble peu probable. En effet, les temps caractéristiques de rétention dans l'actine et à la membrane plasmique sont très similaires (~ 15 s). De plus, les changements d'altitude correspondant à la transition *DrigharrowA* sont obscurcis par l'hétérogénéité du signal des granules de sécrétion (taille, concentration en Dendra2, ...).

Namoin, cette méthode donne une information importante sur la rétention globale des granules de sécrétion à proximité de la membrane plasmique. De plus cette méthode permet d'analyser les extensions enrichies en granules des cellules qui sont impossibles à analyser par l'analyse des trajectoires individuelles des granules, car la densité des granules empêche la segmentation des granules et leur suivi. On peut également imaginer la possibilité de photo-activer les granules dans ces zones enrichies, puis laisser le système s'équilibrer jusqu'à ce qu'il ne reste plus que quelques granules marqués et analyser ensuite leurs trajectoires individuelles. Cependant, les quelques tests que nous avons réalisés ne montrent pas de réduction du nombre de granules marqués dans les régions enrichies même après 10min d'équilibration, suggérant que ces régions sont particulièrement stables.

L'utilisation de la photo-activation peut avoir de nombreuses applications. À l'aide de différentes techniques, on peut sélectivement photo-activer certaines régions : l'onde évanescente permet d'illuminer sélectivement la membrane plasmique attachée au substrat et la région subplasmalemmale, le Spot Illumination (Rap OptoElectronic) permet d'illuminer un cercle de quelques micromètres de diamètre jusqu'à plusieurs dizaines de micromètres, les techniques d'holographie permettent d'illuminer n'importe quel motif dans une cellule (Valentina Emiliani, Université des Saints-Pères, Paris, France). Ces différents modes d'illumination couplés à la photo-activation permettent de nombreuses applications.

- L'analyse de la dynamique de l'actine (voir chapitre 5 page 226)
- Le suivi du transport des protéines : une protéine d'intérêt couplée à une protéine photo-activable peut être convertie dans l'appareil de

Golgi (Spot Illumination, holographie). On peut alors suivre le trajet de la fluorescence pour suivre les différentes étapes de sa maturation.

- Le suivi du recyclage des protéines membranaires des granules de sécrétion. La photo-activation par onde évanescente de protéines de la membrane des granules couplées à une protéine photo-activable pourrait permettre le suivi du signal de fluorescence dans la cellule après stimulation de la sécrétion, et l'identification de voies de recyclage, ainsi que la détermination du temps nécessaire la réutilisation de ces protéines.

2.4 Matériel et méthodes

2.4.1 Anticorps, réactifs et milieux de culture

Les anticorps anti-chromogranine A/B ont été obtenus chez Abcam ; les anticorps de chèvre anti-Myrip ont été obtenus chez Everest Biotechnology. Les anticorps anti-Myosine Va [Espreafico et al., 1992] ont été généreusement offerts par R.E. Cheney (University of North Carolina, Chapel Hill, NC), ou obtenus chez Sigma (LF-18). Les anticorps anti-actine (AC-74) et anti-tubuline (TUB-2.1) ont été obtenus chez Sigma, et l'anti-Myc9B11 chez Cell Signaling Technology. Les réactifs ont été obtenus chez PAA Laboratories. Les purifications d'ADN ont été effectuées avec des kits obtenus chez Macherey-Nagel. Les enzymes utilisées pour la biologie moléculaire ont été obtenus chez New England Biolabs.

2.4.2 Constructions

Pour réaliser un plasmide codant pour une fusion entre la Dendra2 et le neuropeptide-Y (NPY), le plasmide p-Dendra2C (Evrogen) a été digéré par l'enzyme BamH1/EcoRI et sous-cloné dans le plasmide pCDNA.3.1. Le plasmide obtenu a été coupé avec BamH1/NotI, et le fragment a été utilisé pour remplacer le fragment découpé par BamH1/Not1 dans le plasmide pNPY-GFP pour générer la fusion entre NPY et Dendra2. La séquence a été véri-

fiée par séquençage automatisé de l'ADN. Le plasmide pcDNA3-mycRab11b nous a été généreusement donné par M. Cormont (INSERM U895, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Nice, France). Les vecteurs codants pour la forme humaine portant un marqueur Myc de Myrip, la Myosine Va humaine, et NPY ont été décrits dans : [El-Amraoui et al., 2002, Desnos et al., 2007b]. Pour générer un mutant de Myrip résistant au duplex pARNi, trois mutations silencieuses correspondant aux nucléotides 2, 9 et 11 du duplex Myryp-pARNi1 (brin sens) ont été introduites par mutagenèse utilisant la PCR dans la construction Myrip marquée par Myc. Nous avons vérifié par immunofluorescence que l'expression de cette construction de restauration n'était pas réduite par le traitement par le duplex Myrip-pARNi1, comparé à la construction Myrip originale.

2.4.3 Cellules, milieux de culture et transfection

Les cellules BON ont été cultivées dans du milieu de Ham F-12/DMEM avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) à 37°C sous 5% de CO₂. Les cellules ont été déposées sur des lamelles de verre recouvertes de collagène avant transfection. Les observations en imagerie à onde évanescente ont été faites dans des boîtes à fond de verre (MatTEK ou World Precision Instruments). Les duplex pARNi ont été obtenus chez MWG Biotech. Nous avons utilisé trois duplex pARNi validés dirigés contre la Myosine Va humaine (MyoVa-pARNi1, 5'-GAACAAAUGUGCACUCUUUUU ; MyoVa-pARNi2, 5'-AAA-GUAAGGUCGUUGCUGAAAUU ; MyoVa-pARNi3, 5'-AACUGACUACCUGAAUGAUGA) [Desnos et al., 2007b, Lindsay and McCaffrey, 2011] et deux duplex pARNi dirigés contre Myrip (Myrip-pARNi1, 5'-UAAGUGAGCUGAAGCAGAAUU ; Myrip-pARNi2, 5'-UGGCAGUGAUUCAACAUUU). Les duplex pARNi contrôle sont dirigés contre l'enhanced-GFP (EGFP) ou la luciférase et ont été obtenus chez Eurofin MWG Operon. La transfection des duplex pARNi (30nM) a été effectuée avec de l'interferin (Polyplus Transfection), et la transfection des plasmides avec la lipofectamine 2000 (Invitrogen). Dans certains cas, les cellules BON ont été transfectées par électroporation en présence de duplex pARNi (120nM) puis 24h après, une deuxième transfec-

tion des duplex pARNi a été effectuée avec de l'interferin. $1,5 \cdot 10^6$ cellules ont été collectées dans 50 μ L de PBS (KCl 0,2g/L, KH₂PO₄ 0,2g/L, NaCl 8g/L et Na₂HPO₄ 1,15g/L) contenant le vecteur d'ADN (2–5 μ g), puis électroporées (600V/cm, 8 chocs de 3ms) à l'aide d'un électroporateur PS10 (Jouan), et récupérées dans du milieu à 37°C, puis déposées sur leur substrat. Les expériences ont été conduites 72h après l'initiation de l'inhibition de l'expression par traitement avec les duplex pARNi. Des extraits cellulaires ont été préparés en parallèle pour l'analyse par immuno-détection de l'expression des protéines. Les membranes ont été scannées et quantifiées à l'aide du logiciel *ImageJ*(rsbweb, nih.gov/ij/). Les niveaux d'expression de l'actine ou de la tubuline ont été utilisés pour normaliser l'expression des différents échantillons.

2.4.4 Co-immunoprécipitation

Les cellules BON ont été transfectées deux jours avant l'expérience avec les vecteurs codants pour Myrip marqués Myc et la GFP-MyoVa-tail. L'immunoprécipitation a été réalisée comme décrit dans [Desnos et al., 2003] sur des homogénats de cellules préparés dans du Triton X-100 à 1% en présence de 2 μ M de latrunculine B (Calbiochem) pour récupérer Myrip qui se lie fortement aux filaments d'actine. Les extraits ont été incubés avec des billes recouvertes de G-Sepharose (GEHealthcare) conjuguées avec les anticorps appropriés à 4°C pendant 2h. Après plusieurs lavages et l'éluion dans du milieu Laemmli, les éluats ont été analysés par immuno-détection dénaturante (SDS-PAGE).

2.4.5 Immunofluorescence

L'immuno-marquage a été réalisé comme décrit ici [Desnos et al., 2003]. Les anticorps secondaires ont été couplés avec Cy-3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories), Alexa-488, Alexa-586, ou Alexa-350 (Invitrogen). Les cellules ont été observées à l'aide d'un microscope inversé motorisé en z (Nikon TE2000E) équipé d'un objectif 100X (Ouverture Numérique 1,4) et d'une caméra CCD CoolSnap ES (Roper Scientific). Lorsque c'est indiqué, des piles

d'images en z ont été acquises avec $\Delta z = 200\text{nm}$, et les piles d'images ont été déconvoluées à l'aide du logiciel MetaMorph (Molecular Device). Pour évaluer l'association de la Myosine Va avec les granules de sécrétion, les cellules ont été observées avec les mêmes paramètres d'acquisition. Nous avons d'abord identifié les granules à l'aide du marquage de la protéine fluorescente rouge monomérique (mRFP) fusionnée à NPY. Les structures marquées ont été détectées lorsque le pixel le plus intense était $> 1,25$ fois plus intense que le bruit de fond mesuré dans plusieurs régions de la cellule. Puis, les granules ont été identifiés comme ayant un marquage Myosine Va lorsque le pixel du canal vert le plus intense était $> 1,25$ fois plus intense que le bruit de fond dans le canal vert.

2.4.6 Immuno-microscopie électronique à cryogénéisation à haute pression

Des cellules BON ont été cultivées sur des lamelles thermaxTM(Nunc) et congelées rapidement à l'aide d'un porte échantillon Leica HPM 100 sous haute pression (2100 bars). Les échantillons ont ensuite été rapidement transférés dans l'azote liquide pour conservation. La cryosubstitution et l'inclusion ont été effectuées dans un appareil Reichert AFS (Leica), d'abord dans l'acétone avec 0,1% d'acide tannique à -90°C pendant 40h avec un changement de la solution, puis dans l'acétone avec 2% d'osmium pendant 7h. Les échantillons ont ensuite été lentement réchauffés ($5^{\circ}\text{C}/\text{h}$) jusqu'à -20°C . et incubés pendant quelques heures avant d'être réchauffés ($10^{\circ}\text{C}/\text{h}$) à 4°C . Après plusieurs rinçages avec de l'acétone, les échantillons ont été réchauffés à température ambiante et incubés dans un mélange 50% acétone / 50% Araldite (Polyscience) pendant 1h, suivi par 10% acétone / 90% Araldite pendant 2h. Les échantillons ont ensuite été incubés deux fois dans l'Araldite pure pendant 2h. Les lamelles ont été montées dans de la résine et découpées parallèlement au plan des cellules après retrait de la lamelle thermax. Les sections de 80nm d'épaisseur ont été découpées à l'aide d'un Leica Ultracut E, puis marqués par contraste par incubation avec 2% d'uranyl dans l'eau pendant 10min et du citrate de plomb pendant 10min. Ces sections ont été

observées dans un microscope Philips TENAI 12 (FEI).

2.4.7 Imagerie à onde évanescente

Acquisition

Les cellules BON ont été transférées dans du milieu de Locke (154mM de NaCl, 5,5mM de KCl, 5,6mM de Glucose, 3,5mM de NaHCO₃, 15mM d'HEPES, 2,5mM de CaCl₂, 1,2mM de MgCl₂, pH 7,4 ajusté avec du NaOH). Le montage du microscope à onde évanescente est un microscope à prisme (voir [Huet et al., 2006] et section 1.9.3 page 76). La profondeur d'évanescence δ est réglée à 150nm. Dans les conditions d'observation, un pixel correspond à 107,5nm. Des vidéos ont été acquises à 9,98Hz pendant 40–60s avec un temps d'exposition de 100ms. L'excitation a été effectuée avec un laser à argon dont deux raies ont été alignées (488nm et 514nm), et le signal a été collecté au travers de filtres optiques (bande passante, 500–540nm ; passe-haut, >565nm) (Melles Griot).

Analyse de la densité des vésicules

La densité de structure fluorescente a été évaluée à l'aide du logiciel MIA (Multidimensional Image Analysis), un logiciel de segmentation basé sur les ondelettes [Racine et al., 2006] et exprimé comme le rapport du nombre de structures marquées avec NPY-mRFP ou -GFP observées dans le champ d'évanescence sur l'empreinte de la cellule.

Analyse des trajectoires individuelles

Le suivi des trajectoires individuelles dans le plan (x,y) des granules de sécrétion a été réalisé à l'aide du logiciel MIA.

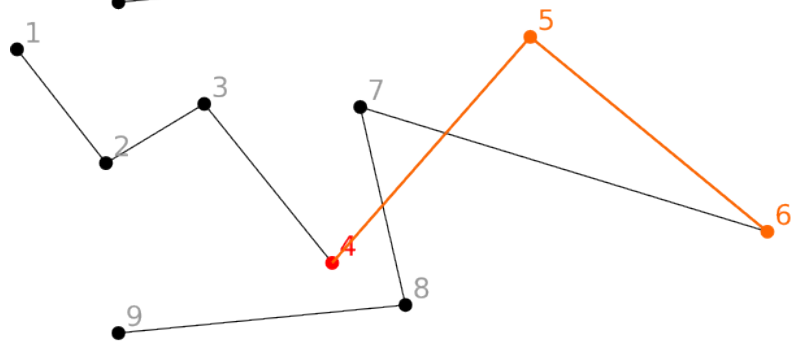
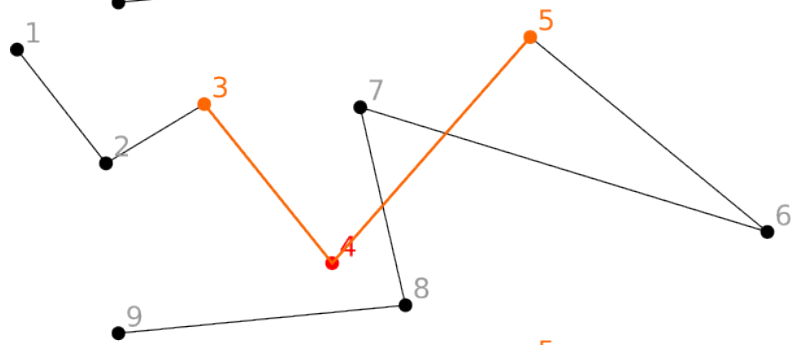
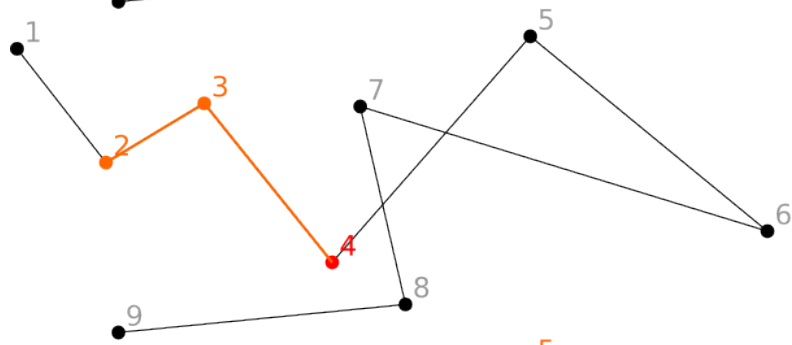
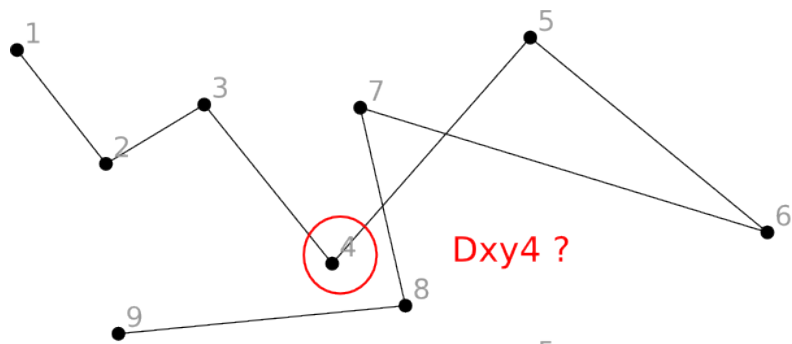
Chaque trajectoire a été vérifiée et nettoyée d'éventuelles erreurs de suivi automatique. Le déplacement carré moyen (*Mean Square Displacement*, MSD, une fonction du temps qui donne la distance au carré moyenne parcourue par

la particule en un temps donné) a été calculé sur l'ensemble de la trajectoire.

$$MSD(t) = \sum_{i=0}^{15} (\overrightarrow{|p(i+t) - p(i)|})^2 \quad (2.1)$$

Avec $\overrightarrow{p(i+t) - p(i)}$ le vecteur du déplacement entre les points $i+t$ et i . Le coefficient de diffusion moyen D_{xy} est obtenu en ajustant une droite sur les 15 premiers points de la courbe du MSD, $MSD(t) = a + bt$, la pente b vaut 4 fois le coefficient de diffusion de la vésicule ; $D_{xy} = \frac{b}{4}$.

La mesure des D_{xy} instantanés se fait par une méthode de fenêtre glissante. Pour chaque ensemble de 25 points contigus de la trajectoire, on calcul le D_{xy} à l'aide de la méthode décrite ci-dessus. On attribue à chaque point de la trajectoire un coefficient de diffusion égal à la moyenne des coefficients de diffusion trouvés pour chaque position de la fenêtre glissante qui contient le point. Voir FIGURE 2.4.7 page suivante pour un cas simplifié avec une analyse sur une fenêtre de 3 points au lieu de 25.



$$Dxy4 = \text{Moyenne}[Dxy(2,3,4), Dxy(3,4,5), Dxy(4,5,6)]$$

FIGURE 2.16 – Méthode de détermination des coefficient de diffusion instantanés. On se place dans un cas simple ici où on calculerait les coefficients de diffusion sur 3 points au lieu de 25. Pour déterminer le coefficient de diffusion du point 4, on détermine le MSD(t) de tous les ensembles de 3 points contigus qui contiennent le point 4. Pour chaque ensemble, on détermine un coefficient de diffusion. On attribue comme coefficient de diffusion au point 4 la moyenne des coefficients de diffusion trouvés pour chaque ensemble qui contient le point 4. La méthode est moins précise pour les extrémités puisqu'un seul ensemble contient le premier point, par exemple.

On considère qu'une vésicule est immobile si le coefficient de diffusion instantané D_{xy} est inférieur à $5 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$. Ce seuil est 5 fois supérieur au minimum que notre montage peut mesurer (estimé à l'aide de billes diffusant dans le glycérol) [Huet et al., 2006], et c'est le seuil en dessous duquel 95% des vésicules passent avant de fusionner. On relève alors le nombre de points contigus avec $D_{xy} < 5 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$, et on en déduit la durée de l'immobilisation.

On trace alors la courbe de la survie de l'immobilisation en fonction de sa durée. Cette courbe peut être ajustée par une double exponentielle à l'aide du logiciel SigmaPlot :

$$N(t) = N_1 e^{-t/\tau_1} + N_2 e^{-t/\tau_2} \quad (2.2)$$

N_1 et N_2 représentent l'abondance des deux composantes, et τ_1 et τ_2 représentent les temps caractéristiques d'immobilisation.

La composante courte (N_1, τ_1) peut être contaminée par des mouvements diffusifs lents, cependant, il est peu probable que la composante longue (N_2, τ_2) soit contaminée. Cette population est donc considérée comme arrimée à la membrane plasmique.

Pour les méthodes utilisées pour analyser la contamination, et les calculs d'anomalie, voir [Huet et al., 2012].

Photo-activation et mesure du temps de rétention

La protéine de fusion NPY-Dendra2 a été transfectée dans les cellules BON. La protéine Dendra2 est une protéine fluorescente photo-activable dont

le spectre d'émission se décale du vert vers le rouge suite à une illumination à 405nm. Une diode laser UV (405nm, 50mW, Laser Components) a été couplée à notre microscope à onde évanescente et alignée avec le laser à argon à l'aide d'un miroir dichroïque. Deux jours après la transfection, les cellules ont été observées par imagerie à onde évanescente avec une profondeur d'évanescence $\delta = 100\text{nm}$. Une exposition de 2s aux UV par onde évanescente permet de photo-converter $64 \pm 8\%$ ($n = 15$ cellules) des vésicules marquées en vert présentes dans le champ évanescent. Le signal rouge obtenu est alors trois fois supérieur au fond. L'augmentation de la durée de la photo-activation au delà de 2s n'augmente pas significativement le signal rouge, mais augmente la variabilité. Après photo-conversion, une pile d'images est acquise pendant 1min à une fréquence de 0,5Hz avec une exposition de 200ms. La Dendra2 n'est pas significativement photo-convertie par ce rayonnement à 514nm. Les images ont été quantifiées à l'aide du logiciel *ImageJ*. Pour chaque cellule, le bruit de fond a été mesuré dans des régions sans granule, et sa valeur a été soustraite à tous les pixels de l'image. L'empreinte des cellules a été dessinée manuellement, et l'intensité de fluorescence intégrée a été mesurée sur la surface de l'empreinte. Pour déterminer le nombre de granules de sécrétion, les images ont été séquencées avec le logiciel MIA, et le nombre de vésicule a été compté sur chaque image. Le photo-blanchiment a été estimé sur des cellules vivantes en mesurant la diminution de la fluorescence de granules immobiles, donnant une estimation de la borne maximale du photo-blanchiment puisque les granules immobiles sont le plus souvent arrimés à la membrane plasmique, et donc proches de l'interface verre/eau où l'intensité de l'onde évanescente est maximale. Les courbes de l'intensité de fluorescence dans le canal rouge ont alors été ajustées avec une simple exponentielle, donnant le temps caractéristique de la décroissance du signal.

Cdc42 et le pore de fusion

Cdc42 permet l'élargissement du pore de fusion en régulant la tension de la membrane plasmique

3.1 Introduction

Le cytosquelette est un réseau de différents polymères protéiques qui donnent ses *propriétés mécaniques* à la cellule et aux tissus. Le cortex d'actine est un composant important du cytosquelette. Au cours de l'exocytose le cortex d'actine en contact avec la membrane plasmique est remodelé. De nombreuses protéines sont impliquées dans la dynamique de l'actine, notamment des protéines de signalisation : les Rho GTPases (*Rac Homologus*), dont Cdc42 fait partie. Nous avons étudié le rôle de Cdc42 dans l'exocytose.

3.1.1 Rôles du cytosquelette dans l'exocytose régulée

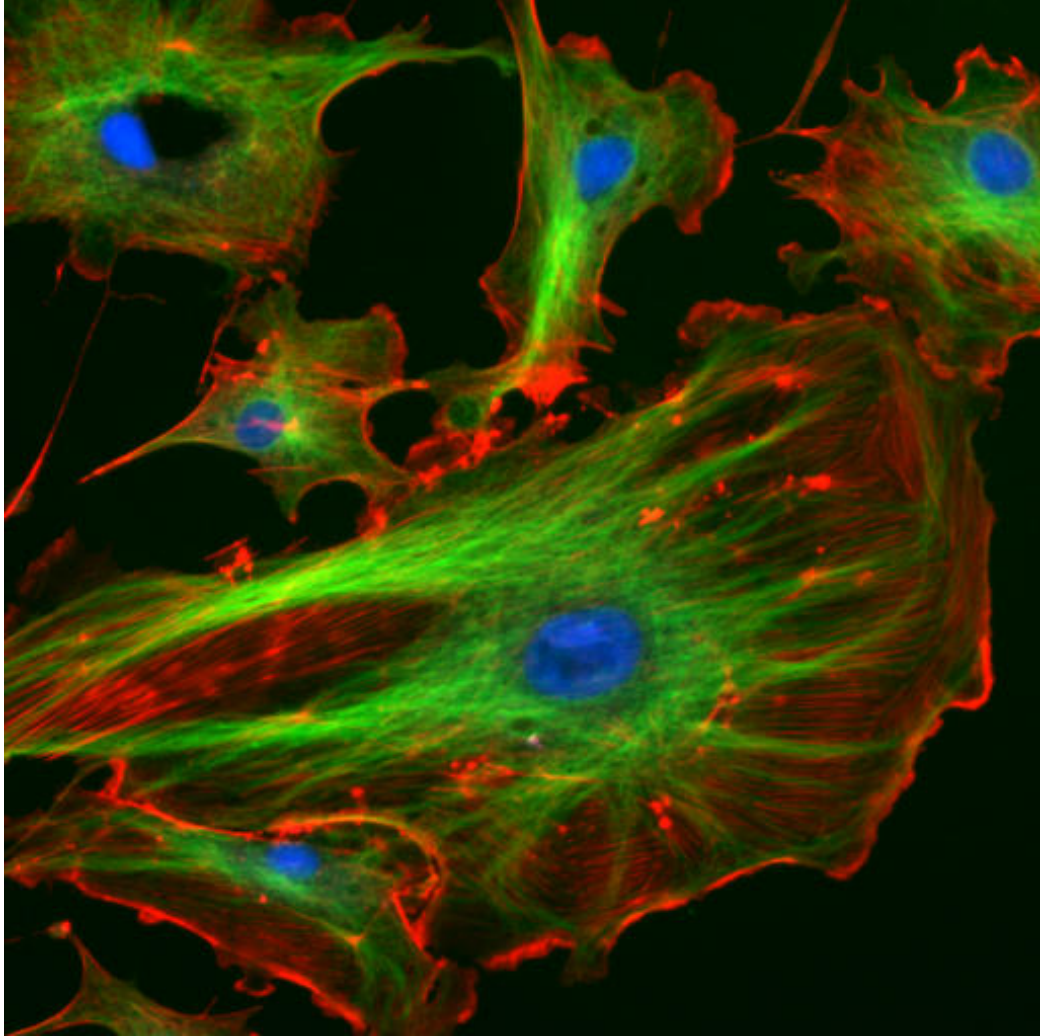


FIGURE 3.1 – Triple marquage du cytosquelette de cellules endothéliales. Les filaments d'actine sont marqués en rouge (phalloïdin), les microtubules en vert (anticorps reconnaissant FITC), et la lamine est marquée en bleu (DAPI). *Source : site web d'imagej*

Les rôles du cytosquelette dans l'exocytose sont multiples. Ces différentes fonctions sont assurées par différentes structures composant le cytosquelette. Sa composition est assez largement conservée chez les cellules eucaryotes

animales, mais peut comporter des structures supplémentaires afin d'assurer certaines fonctions spécialisées (par exemple, la cellule musculaire contractile) ([Severs, 2000]).

Il se compose de 3 éléments principaux :

- les filaments intermédiaires,
- les microtubules,
- le cortex d'actine.

Ces trois structures assurent des fonctions spécialisées, dont certaines jouent un rôle important dans l'exocytose régulée.

Anatomie du cytosquelette

Les filaments intermédiaires sont des polymères de kératine ou de lamine de 10nm de diamètre.

Les filaments de kératine assurent principalement le maintien de l'intégrité cellulaire et tissulaire au travers d'un réseau de filaments reliés à des jonctions intercellulaires [Russell et al., 2004].

Les filaments de lamine doublent la face interne de l'enveloppe nucléaire. Ils permettent de lui donner sa forme et de soutenir l'enveloppe [Youngjo Kim and Zheng, 2012].

Les microtubules sont des polymères de tubuline α et β de 25nm de diamètre. Ils sont organisés autour du centrosome (paire de centrioles), qui fonctionne comme un centre organisateur des microtubules (MTOC), situé à proximité du noyau de la cellule. Les extrémités (-) du microtubule sont fixées au centrosome, les extrémités (+) sont dirigées vers la membrane plasmique. Le réseau est très dynamique : les microtubules sont dans un état d'instabilité dynamique [Mitchison T, 1984], en alternant polymérisation et dépolymérisation en catastrophe. Les microtubules sont impliqués dans de nombreux phénomènes, comme la migration cellulaire, la polarisation [Stiess and Bradke, 2011] ou le transport intracellulaire [de Forges et al., 2012]. Ils sont impliqués dans la mitose, au cours de laquelle ils assurent la séparation des chromosomes vers les deux cellules filles [Wadsworth et al., 2011].

Ils sont également impliqués dans le transport d'organites, en particulier des vésicules de sécrétion (voir section 3.1.1).

Le cortex d'actine est un réseau dense constitué de filaments fins d'actine de 5nm à 9nm de diamètre. Ce réseau d'une épaisseur d'environ 200nm se situe dans la zone subplasmalemmale de la cellule [Nakata, 1992] (voir FIGURE 3.1.1 page 151). *Almers et al.* le décrivent comme faisant environ 400nm. Le cortex d'actine intervient dans des phénomènes très variés, comme la fin de la cytotérière en fin de mitose [Glotzer, 2001], la migration cellulaire [Bugyi and Carlier, 2010], mais aussi l'exocytose (voir section 3.1.1 page suivante). Dans les cellules immunitaires, l'actine joue aussi un rôle dans le système d'acto-myosine qui régule la tension membranaire [Parsons et al., 2010].

Micro-tubules, les rails d'acheminement des vésicules de sécrétion

Les vésicules de sécrétion dans les cellules neuro-endocrines sont formées au niveau du trans-Golgi (voir section 1.3.2 page 7). La perturbation du réseau de microtubules diminue la libération d'hormones [Alexander et al., 2005], et on peut observer un mouvement dirigé des granules de sécrétion dépendant des microtubules dans les cellules PC12 [Rudolf et al., 2001]. Dans les neurones, on observe un transport vers la synapse, ainsi qu'un transport rétrograde permettant le recyclage des granules ; ce retour est inhibé par la stimulation du neurone [Shakiryanova et al., 2006].

Le transport est assuré par des moteurs moléculaires. Il a été montré dans de nombreuses cellules neuro-endocrines que le transport antérograde vers la membrane plasmique était assuré par la kinésine-1 : dans les cellules acineuses du pancréas [Hamm-Alvarez et al., 1997], dans les neurones [Senda and Yu, 1999], les cellules β pancréatiques [Varadi et al., 2003].

Le transport rétrograde permettant le recyclage des vésicules après stimulation est assuré par la dynéine [Varadi et al., 2003]. Ce transport est régulé par la dynactine, qui est un activateur de la kinésine et de la dynéine [Berezuk and Schroer, 2007, Gill et al., 1991].

Après le transport antérograde des vésicules, celles-ci interagissent avec le cortex d'actine.

Cortex d'actine, barrière et plateforme d'arrimage

Le cortex d'actine joue un rôle encore ambigu dans l'exocytose (voir la revue [Malacombe et al., 2006a]). Le cortex d'actine est constitué de mailles plus petites que les vésicules de sécrétion, et sépare les vésicules de sécrétion de la membrane plasmique (voir FIGURE 3.1.1 page ci-contre). Dans les cellules chromaffines ou les cellules pancréatiques beta, on observe une corrélation entre les sites de dépolymérisation de l'actine et l'exocytose, ainsi qu'une augmentation du nombre des vésicules arrimées à la membrane plasmique et de l'exocytose lorsque l'on utilise des drogues qui dépolymérisent l'actine [Nakata, 1992, Vitale et al., 1995, Orci et al., 1972, Sontag et al., 1988]. Ce rôle de barrière pourrait être également un rôle de barrière à double sens, puisque son réseau dense semble limiter la diffusion du calcium et de petites molécules, pouvant confiner l'augmentation du calcium intracellulaire lors de la stimulation à la seule région subplasmalemmale [Gutiérrez and Gil, 2011]. Cependant, les stimulations utilisées pour démontrer ce rôle de barrière sont souvent peu physiologiques (10min), et il a été montré que le réseau d'actine n'est pas continu [Nakata, 1992], de plus le cortex d'actine comporte des structures polygonales qui pourraient enfermer les granules de sécrétion mais aussi les mener aux sites d'exocytose [Giner et al., 2007, Riedl et al., 2008], remettant en cause l'idée de simple barrière.

D'autres données indiquent que le modèle de barrière ne permet pas de décrire complètement le rôle de l'actine. L'utilisation de drogues qui dépolymérisent l'actine augmentent l'exocytose, mais l'utilisation de doses plus fortes de ces drogues inhibent l'exocytose [Orci et al., 1972, Gasman et al., 2004]. La déplétion totale des filaments d'actine bloque la drégranulation des mastocytes [Pendleton and Koffer, 2001]. De plus, l'actine réduit la mobilité des vésicules à l'approche de la membrane plasmique dans les cellules chromaffines [Johns et al., 2001, Oheim et al., 1999], et cette mobilité augmente lorsque le cortex d'actine est dépolymérisé (voir chapitre 2 page 87)[Steyer

and Almers, 1999, Desnos et al., 2003]. Dans les cellules PC12, il apparaît même qu'au-delà du rôle de séquestration des vésicules, l'actine permette leur déplacement le long de la membrane plasmique [Lang et al., 2000]. Dans les cellules chromaffines, il a été observé la formation de structures perpendiculaires à la membrane plasmique permettant éventuellement de guider les vésicules vers les régions où l'actine était dépolymérisée [Giner et al., 2005].

La dépolymérisation de l'actine est nécessaire à l'exocytose, mais la polymérisation *de novo* de nouvelles structures semble également indispensable au bon fonctionnement de l'exocytose.

Les fonctions de l'actine restent donc débattues. Elle pourrait jouer un rôle de barrière, de plateforme d'arrimage des vésicules après le transport sur les micro-tubules, de tapis roulant amenant les vésicules vers les sites de fusion, ou plus probablement une combinaison de ces différentes fonctions. C'est donc un composant clé du cytosquelette pour l'exocytose.

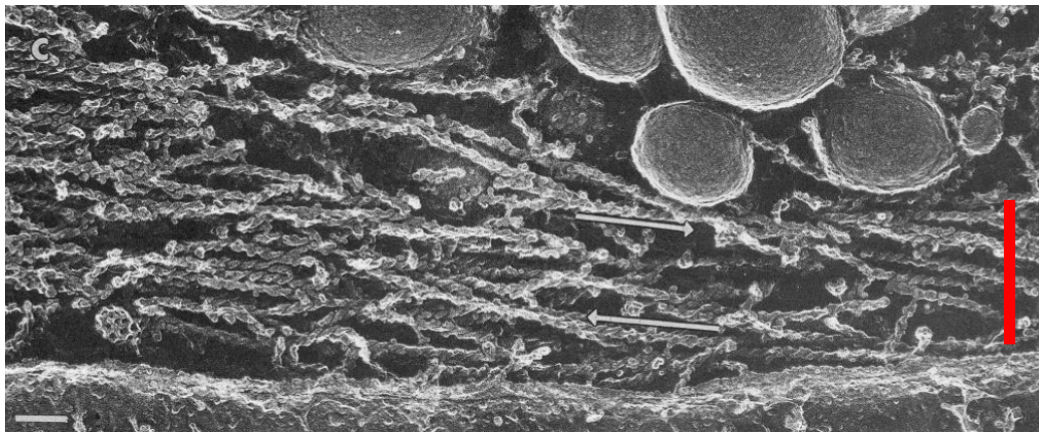


FIGURE 3.2 – On peut voir des vésicules de sécrétion séparées de la membrane plasmique par un cortex d'actine (indiquée en rouge). L'échelle graphique est de 100nm. Source : [Nakata, 1992]

3.1.2 Dynamique du cortex d'actine

La régulation de la dynamique du cortex d'actine est très importante pour le bon fonctionnement de l'endocytose. C'est un phénomène régulé et étroitement contrôlé. La dynamique de polymérisation, de dépolymérisation et de stabilisation de l'actine est régulée par plusieurs voies :

Stabilisation du cortex d'actine

Fodrine. La Fodrine est impliquée dans la stabilisation du cortex d'actine. La Fodrine est la forme neuronale de la spectrine. La spectrine est une protéine qui forme un échaffaudage pentagonal ou hexagonal à l'intérieur de la cellule, le long de la membrane plasmique. Elle joue un rôle dans le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique et dans la structure du cytosquelette [Huh et al., 2001].

La Fodrine est une protéine se liant à l'actine qui est recrutée dans la région corticale des cellules chromaffines. Lors de la stimulation par augmentation du calcium intracellulaire, la Fodrine se réorganise en agglomérats à la membrane plasmique. Son rôle est de réticuler l'actine en liant les filaments les uns aux autres [Perrin and Aunis, 1985]. L'utilisation d'anti-Fodrin inhibe la sécrétion stimulée par le calcium de catécholamines [Perrin et al., 1987]. L'augmentation du calcium empêche l'activité de réticulation de la Fodrine, et permet la dépolymérisation de l'actine [Aunis and Bader, 1988]. La Fodrine a donc un rôle stabilisateur du cortex d'actine.

D'autres protéines interviennent dans la réticulation du cortex d'actine comme la Vinculine, la Filamine, et la Spectrine [Aunis and Bader, 1988].

Rho GTPases. Les Rho GTPases sont des protéines qui sont impliquées dans le trafic des vésicules au cours de l'exocytose et de l'endocytose [Ridley, 2001, Symons and Rusk, 2003]. Dans les cellules PC12, RhoA est associée aux vésicules de sécrétion. Elle est impliquée en aval de Go, une protéine associée aux vésicules de sécrétion, impliquée dans leur maturation [Gas-

man et al., 1998, Vitale et al., 1996]. L'inhibition de RhoA par une toxine n'a pas d'effet sur la sécrétion de catécholamines, mais son activation par la stimulation de Go ou la sur-expression d'un mutant actif de RhoA inhibe la sécrétion et stabilise le cortex d'actine [Gasman et al., 1997, Bader et al., 2004]. La stabilisation de l'actine par RhoA passe par le contrôle de la 4-kinase phosphatidylinositol (PI 4-kinase) qui est associée aux vésicules de sécrétion [Gasman et al., 1998]. La PI 4-kinase permet la formation de phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) lié aux vésicules. PIP2 interagit avec de nombreuses protéines du cytosquelette, initie la nucléation de l'actine et régule les interactions entre la membrane plasmique et le cytosquelette [Yin and Janmey, 2003, Raucher et al., 2000, Sechi and Wehland, 2000]. Donc PIP2 dont la formation est permise par RhoA pourrait jouer un rôle de stabilisation du cortex d'actine en maintenant les vésicules arrimées à la membrane plasmique.

Dépolymérisation de l'actine

Scindérine. Cette protéine, présente dans de nombreux tissus à forte activité sécrétrice (cerveau, foie, glandes salivaires, etc.), co-localise avec les filaments d'actine périphériques au repos comme en condition stimulée [Vitale et al., 1991]. Des expériences *in vitro* sur protéines purifiées ont permis de démontrer que la scinderine se lie à PIP2 et à l'actine, et clive les filaments d'actine en présence de calcium [Marcu et al., 1996]. Le clivage de l'actine par la scinderine favorise l'exocytose des catécholamines [Marcu et al., 1996, Zhang et al., 1996]. La scindérine permettrait donc d'ouvrir la voie aux vésicules lors de la stimulation.

Polymérisation de l'actine

Il n'a pas encore été montré formellement que la polymérisation de structures d'actine *de novo* est un phénomène indispensable à l'exocytose dans les cellules neuro-endocrines. Pourtant un faisceau d'indices laisse penser qu'il s'agit d'un phénomène important.

Dans les mastocytes, mais aussi dans l'activité synaptique des neurones,

la polymérisation de l'actine semble jouer un rôle dans l'exocytose [Pendleton and Koffer, 2001, Colicos et al., 2001, Sankaranarayanan et al., 2003]. De plus, on peut observer la formation d'une couche d'actine autour des vésicules de sécrétion dans les acini du pancréas [Valentijn et al., 2000]. Il apparaît donc que la polymérisation d'actine ait un effet positif sur l'exocytose.

Les Rho GTPases ont justement un effet positif sur l'exocytose et interagissent avec le cytosquelette. Cependant il n'est pas démontré que le mécanisme passe par la polymérisation de l'actine. Rac1 et Cdc42 sont impliquées dans la dégranulation des mastocytes [Valentijn et al., 2000]. Rac2 contrôle la libération des granules dans les neutrophiles [Abdel-Latif et al., 2004], et Rac1 favorise la libération de neurotransmetteurs dans les neurones [Doussau et al., 2000, Humeau et al., 2002]. Cdc42 est également impliquée dans la sécrétion d'insuline dans les cellules beta du pancréas [Nevins and Thurmond, 2003].

Cdc42. Dans les cellules chromaffines et PC12, Cdc42 se trouve dans la région subplasmalemmale [Gasman et al., 1999, Gasman et al., 1998]. La sur-expression d'un mutant actif de Cdc42 mène à la formation de filaments d'actine à proximité de la membrane plasmique dans les cellules PC12, conduisant à une stimulation de l'exocytose [Gasman et al., 2004, Bader et al., 2004]. À l'inverse, l'inhibition de l'expression de Cdc42 par ARN interférent réduit fortement l'exocytose [Malacombe et al., 2006b]. Cependant, le rôle exact de Cdc42 dans l'exocytose n'est pas élucidé : quelle étape est affectée par Cdc42 ? Est-ce le transport des vésicules de sécrétion, l'arrimage au cortex d'actine, la capacité à fusionner ou la capacité à libérer le contenu vésiculaire dans le milieu extérieur ?

Des effecteurs de Cdc42 ont été identifiés : N-WASP et le complexe Arp2/3. Ces deux effecteurs participent à la nucléation de l'actine [Mullins, 2000], ainsi qu'à la dynamique de nombreuses organelles, comme les vésicules de sécrétion et les vésicules d'endocytose [Taunton, 2001]. Frantz et al. ont proposé l'intervention de N-WASP dans l'exocytose des cellules PC12 [Frantz et al., 2002]. La sur-expression de N-WASP induit une augmentation de l'exocytose comparable à celle obtenue par sur-expression du mutant actif

de Cdc42. Cette augmentation dépend de la capacité de N-WASP à polymériser l'actine. Arp2/3 est associée aux vésicules de sécrétion et reste associée aux vésicules pendant l'arrimage à la membrane plasmique. Il s'agirait des nouveaux filaments d'actines polymérisés qui stimuleraient l'exocytose [Gassman et al., 2004]. La formation de ces filaments se ferait par l'interaction de Cdc42 et N-WASP situés à la membrane plasmique avec Arp2/3 situé sur les vésicules de sécrétion. Ces résultats suggèrent une activité post-arrimage à la membrane plasmique. Ainsi Cdc42 pourrait jouer un rôle dans la régulation de la dilatation du pore de fusion.

Plus récemment, il a été montré que la sur-expression d'un dominant négatif de Cdc42 diminuait le nombre d'évènements d'exocytose observé par imagerie à onde évanescente dans les cellules PC12, alors que la sur-expression de Cdc42, ou d'un mutant constitutivement actif l'augmentait [Sato et al., 2012]. Les auteurs observent également une augmentation du nombre de granules de sécrétion dans la cellule, et concluent que Cdc42 favorise l'exocytose en augmentant le nombre de granules dans la cellule et en augmentant la vitesse de formation du complexe SNARE (voir section 1.7.1 page 34).

3.1.3 La dynamique du pore de fusion

Le pore de fusion est dynamique, et son expansion est régulée par de nombreux mécanismes. Il a été montré que l'expansion du pore de fusion était liée à l'intensité de la stimulation et pouvait mener à une sécrétion différentielle, basée sur une exclusion de la taille des molécules sécrétées.

L'expansion du pore de fusion est liée à l'intensité de la stimulation. De nombreux exemples dans la littérature suggèrent une corrélation entre l'intensité de la stimulation de cellules sécrétrices et la taille des molécules libérées. Il y a plus de 30 ans, *Wilson et al.* observaient une sécrétion différentielle entre des catécholamines et des peptides opioïdes dans une lignée issue de tumeur de chromaffines : l'augmentation de la concentration en calcium ou en sécrétagogue favorise la sécrétion de cargo de plus grande taille (peptides opioïdes). Différentes voies de sécrétion sont alors proposées

comme mécanisme [Wilson et al., 1981]. Ce phénomène semble avoir un rôle physiologique, puisqu'en fonction d'un effort faible ou intense, chez l'Homme, il a été montré qu'il existe une sécrétion différentielle entre les cathécolamines et la Chromogranine A mesurée dans le sang [Takiyyuddin et al., 1990]. Plus récemment, il a été montré qu'entre la sécrétion basale des chromaffines et des conditions stimulées en KCl, la quantité de neurépinéphrines et de NPY sécrétées n'était pas proportionnelle, ce qui suggère une sécrétion différentielle [Cavadas et al., 2002]. Fulop et al. montrent également une sécrétion différentielle dans les chromaffines entre catécholamines et neuropeptide-Y. Ils suggèrent que cette régulation se fait par une sélection par la taille liée à une régulation de l'expansion du pore de fusion [Fulop et al., 2005]. En effet, les différentes molécules sécrétées par les chromaffines sont contenues dans les mêmes vésicules de sécrétion [Crivellato et al., 2008], suggérant une régulation de la libération du contenu des vésicules au moment de la fusion.

Il a été montré dans les chromaffines que la taille du quantum lors de l'exocytose (représentant la quantité de matériel libéré par chaque vésicule lors d'un évènement de fusion) augmentait avec la concentration en calcium [Elhamdani et al., 2001]. Dans des conditions de stimulation basale, les vésicules des chromaffines sécrètent principalement en passant par un mode de fusion partielle (kiss-and-run). Le pore de fusion peut être régulé par la concentration en calcium. À basse concentration, le pore ne se dilate pas, et donne des évènements de fusion partielle, alors qu'à haute concentration, le pore se dilate et donne lieu à des évènements de fusion complète. Cette régulation a été montrée pour les granulocytes éosinophiles de cheval [Hartmann and Lindau, 1995], les cellules pancréatiques β [Takahashi et al., 2002] et dans les mastocytes [Fernández-Chacón and Alvarez de Toledo, 1995]. Lors de ces évènements de fusion partielle, la vésicule garde une forme Ω [Ryan, 2003]. Les vésicules sont ensuite rapidement recyclées [Fulop et al., 2005]. Ce mode de fusion permet la libération de catécholamines au travers d'un pore de fusion contraint [Elhamdani et al., 2006, Fulop and Smith, 2006], mais cette libération n'est pas totale, puisqu'une partie des catécholamines restent dans la vésicule [Wightman et al., 1995]. En revanche, lors de stimulations plus intenses, le pore de fusion se dilate et permet la libération de

peptides [Doreian et al., 2009]. Suit une exocytose principalement composée d'évènements de fusion complète, le processus de recyclage des vésicules passe par la voie d'endocytose impliquant les clathrines [Elhamdani et al., 2001, Chan et al., 2003, Fulop et al., 2005].

L'hypothèse selon laquelle le pore de fusion est responsable de la sécrétion différentielle basée sur la taille des molécules sécrétées a été proposée par Rahamimoff et Fernandez [Rahamimoff and Fernandez, 1997]. Cette hypothèse a été soutenue par certains résultats expérimentaux [Elhamdani et al., 2006, Fulop and Smith, 2006].

Il a été montré que la régulation entre un mode de fusion complète et un mode de fusion partielle peut être influencée par la quantité de d'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) [Angleson et al., 1999]. Perrais et al. ont montré que dans les cellules chromaffines, lors de la fusion, des molécules plus volumineuses étaient libérées avec un délai, et pouvaient ne pas être libérées du tout [Perrais et al., 2004]. Il a ensuite été montré que l'intensité de la stimulation menait à la libération de molécules de tailles différentes [Fulop et al., 2005].

La synaptotagmine. L'expansion du pore de fusion dépend de l'activité, et donc de la concentration en calcium. Ceci suggère l'intervention d'un détecteur de calcium. En plus de son rôle dans le déclenchement de la fusion (voir section 1.7.2 page 46), la synaptotagmine joue également un rôle dans la régulation du mode de fusion [Wang et al., 2001]. La sur-expression de la synaptotagmine 4 dans les cellules PC12 augmente la fréquence des évènements de fusion partielle. La mutation du domaine C2A de la synaptotagmine 1 diminue la fusion complète, alors que la mutation du domaine C2B diminue la fusion partielle. La synaptotagmine 4 est moins sensible au calcium que la synaptotagmine 1, ce qui suggère que l'intervention d'une des isoformes peut être privilégiée en fonction de la concentration du calcium.

Phospholipidase D (PLD). La composition en lipides joue un rôle dans l'amorce de la fusion (voir section 1.7.1 page 45) et pourrait jouer un rôle important dans l'expansion du pore de fusion. La PLD est une protéine mem-

branaire impliquée dans la synthèse de l'acide phosphatidique (PA). La PLD est un bon candidat pour participer à l'expansion du pore de fusion. Dans les neurones d'*Aplysia*, d'un dominant négatif de PLD1 diminue la libération d'acétylcholine, sans que la sensibilité au calcium de la fusion ou le trafic et l'arrimage soient perturbés [Humeau et al., 2001]. Ces données suggèrent que l'étape affectée par PLD se situe en aval de la fusion, donc possiblement la régulation du pore de fusion. Dans les cellules chromaffines, la sur-expression de PLD augmente l'exocytose alors que la sur-expression d'un dominant négatif la diminue [Vitale et al., 2001].

Dynamine. Il apparaît donc que la dilatation du pore de fusion est un phénomène régulé. Cependant le mécanisme de la régulation du pore de fusion reste inconnu. *Chan et al.* proposent une régulation du pore de fusion par l'intervention de la dynamine [Chan et al., 2010]. La dynamine serait recrutée au cou des vésicules et participerait à la refermeture du pore par polymérisation de l'actine [Artalejo et al., 1995, Artalejo et al., 2002]. Le blocage de l'endocytose rapide qui implique la dynamine des granules perturbe le maintien de la sécrétion dans le temps [Elhamdani et al., 2001]. Cependant, *Holz et al.* confirment un rôle de la dynamine dans la régulation du pore de fusion, mais pas par le mécanisme proposé par *Chan et al.* puisqu'ils n'observent pas de recrutement de la dynamine aux sites d'exocytose [Anantharam et al., 2011] dans les chromaffines. En revanche, dans les PC12, la dynamine est bien recrutée aux sites d'exocytose [Felmy, 2009]. Ce modèle suggère que le recrutement de la dynamine au cou de la vésicule pendant l'exocytose soit très rapide, puisque l'expansion du pore de fusion se produit en quelques millisecondes.

Protéine Kinase C (PKC) La protéine kinase C (PKC) pourrait jouer également un rôle, car son activation chimique dans les cellules chromaffines augmente le nombre d'occurrences d'évènements de fusion complète [Fulop and Smith, 2006]. Cette régulation pourrait par l'activation de la Myosine II.

Myosine II. La Myosine II joue également un rôle dans l'expansion du pore de fusion. La Myosine II est activé par phosphorylation en présence de calcium par la MLCK (myosin light-chain kinase). La phosphorylation de la Myosine II augmente la probabilité d'expansion du pore de fusion [Neco et al., 2008], alors que l'inhibition de la Myosine II conduit à la stabilisation du pore de fusion [Berberian et al., 2009]. Dans des conditions de stimulation aiguë, la Myosine II est phosphorylée, et permet la transition d'un mode de libération partielle à un mode de libération complète des vésicules [Doreian et al., 2008], permettant ainsi la libération de la chromogranine [Doreian et al., 2009]. La Myosine II est également impliquée dans la fusion complète de vésicules dans les glandes salivaires [Masedunskas et al., 2011], dans les cellules épithéliales sécrétrices [Bhat and Thorn, 2009]. Dans les cellules PC12, Tsuboi et al. montrent que la Myosine II régule le temps d'ouverture du pore de fusion et par conséquent la quantité d'hormones libérées [Aoki et al., 2010].

Cependant, le mécanisme d'action de la dynamine ou de la Myosine II sur le pore de fusion n'a pas été élucidé. Un des mécanismes évoqué dans la littérature est l'influence de la tension de la membrane sur le pore de fusion. Or la Myosine II peut interagir avec le cortex d'actine pour créer des forces de tension, et la dynamine est impliquée dans la scission des vésicules d'endocytose, et donc exerce également des forces sur la membrane.

La polymérisation de l'actine. La polymérisation de l'actine pourrait avoir un rôle dans l'expansion du pore de fusion, mais les données sont contradictoires. Berberian et al. montrent que l'inhibition de la polymérisation de l'actine par la Cytochalasine D stabilise le pore de fusion [Berberian et al., 2009], Doreian et al. observent qu'avec la même drogue, la dilatation du pore de fusion est favorisée [Doreian et al., 2008].

3.1.4 Tension de la membrane plasmique

La tension de la membrane plasmique est étroitement régulée, en particulier dans les cellules exposées au stress mécanique [Sinha et al., 2011]. Elle est impliquée dans de nombreux phénomènes physiologiques : la mobilité cellu-

laire [Gauthier et al., 2011, Liu et al., 2012], l'adhésion [Krobath et al., 2011], la cytokinèse [Reichl et al., 2008], et l'endocytose [Boulant et al., 2011].

Des modèles théorique suggèrent qu'un pore de fusion de petite taille a tendance à se refermer, et que l'expansion n'est pas un phénomène spontané [Chernomordik and Kozlov, 2008]. Il est proposé que la barrière d'énergie nécessaire à la dilatation du pore de fusion soit liée au changement de la courbure de la membrane plasmique lors d'un évènement d'exocytose [Zhang and Jackson, 2010]. La modélisation du pore de fusion montre que la tension de la membrane pourrait être la force motrice de l'expansion du pore de fusion [Chernomordik and Kozlov, 2008, Amatore et al., 2000, Chizmadzhev et al., 2000, Katsov et al., 2004]. Seules quelques pistes expérimentales lient la tension membranaire et l'exocytose. Lors de la migration des fibroblastes, la tension de la membrane plasmique augmente avant l'activation de l'exocytose [Gauthier et al., 2011]. Cependant, ces phénomènes ont été peu étudiés dans les cellules neuro-endocrines.

La tension de la membrane plasmique est la somme de deux composantes : la tension linéaire entre les lipides, et l'interaction entre le cortex d'actine et la membrane plasmique [Raucher and Sheetz, 1999]. Récemment, dans les cellules immunitaires, il a été montré que le cortex d'actine participait à la régulation de la tension de la membrane plasmique [Parsons et al., 2010].

Certaines Myosines ont été impliquées dans la régulation de la tension de la membrane plasmique :

- La Myosine I peut se lier aux filaments d'actine et à la membrane plasmique, et régule la tension de la membrane plasmique [Nambiar et al., 2009]. La processivité de la Myosine I est interrompue par l'augmentation du calcium intra-cellulaire (voir la revue [McConnell and Tyska, 2010]).
- La Myosine II est également impliquée dans la régulation de la tension de la membrane plasmique des lymphocytes T lors de la cytokinèse [Straight et al., 2003, Tooley et al., 2005].
- La Myosine VI est proposée comme intervenant dans la tension de la membrane grâce à ses propriétés mécano-sensibles [Chuan et al., 2011].
- La Myosine VII serait impliquée dans le maintien de la tension des

cellules impliquées dans l'audition [Henn and De La Cruz, 2005]

Le lien entre la Myosine II et la dilatation du pore de fusion (voir section 3.1.3 page 155) suggère qu'il pourrait y avoir un lien entre la tension de la membrane et l'exocytose dans les cellules neuro-endocrines, mais il reste peu étudié.

3.1.5 Hypothèses et objectifs

Comme nous l'avons vu dans cette introduction :

- Le cortex d'actine joue un rôle important dans l'exocytose (voir section 3.1.1 page 150) .
- Cdc42 est impliqué dans la dynamique de l'actine (voir section 3.1.2 page 154).
- Cdc42 pourrait jouer un rôle tardif, en particulier sur l'expansion du pore de fusion (voir section 3.1.2 page 154).
- La modélisation prédit que l'expansion du pore de fusion pourrait être liée à la tension de la membrane (voir section 3.1.4 page 159).

Nous avons donc étudié le rôle de Cdc42 sur l'exocytose, et identifié l'étape à laquelle Cdc42 intervient. En particulier, nous avons étudié le rôle de Cdc42 sur l'expansion du pore de fusion en utilisant l'ampérométrie et l'imagerie à onde évanescente. Nous avons corrélé ces expériences avec des mesures de la tension de la membrane plasmique en utilisant un piège optique afin de déterminer le mécanisme de l'expansion du pore de fusion par Cdc42.

3.2 Résultats

Marine Bretou a effectué les mesures d'ampérométrie et de mesure de tension de la membrane plasmique. Claire Desnos et Isabelle Fanget ont effectué l'analyse des données d'arrimage.

3.2.1 Cdc42 diminue le nombre d'évènements d'exocytose

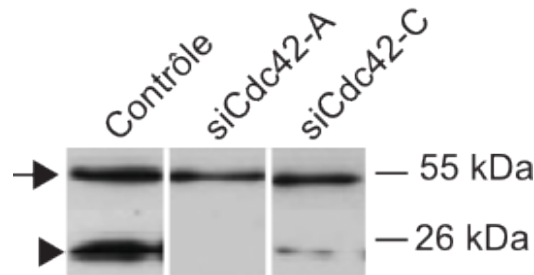


FIGURE 3.3 – Le contrôle est un immunomarquage de la tubuline permettant la normalisation (flèche). La tête de flèche indique la bande correspondant à Cdc42. L'inhibition de l'expression de Cdc42 est supérieure à 70% pour les deux conditions.

Des cellules BON ont été transfectées avec un vecteur codant pour la protéine recombinante NeuroPeptide-Y (NPY) fusionnée avec la protéine fluorescente verte GFP. L'expression de Cdc42 dans ces cellules a été inhibée par la transfection de petits ARN interférents (siRNA) différents (A et C), et comparés à un groupe contrôle transfecté avec un petit ARN interférent contre la luciférase. On notera siCdc42-A les cellules transfectées avec le siRNA A, et siCdc42-C pour celles transfectées avec le siRNA C. Les cellules ont été stimulées individuellement par perfusion locale de ionomycine en présence de 2,4mM de Ca^{2+} et observées individuellement par vidéo-microscopie à onde évanescente pendant une minute à une fréquence de 10Hz.

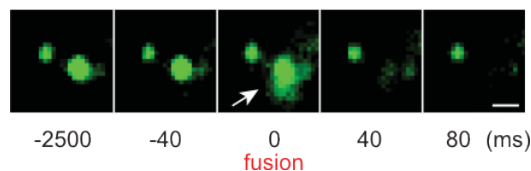


FIGURE 3.4 – Signature d'un évènement de fusion d'une vésicule dans des cellules BON transfectées avec un vecteur NPY-GFP. L'échelle est d'1 μm .

Lorsque les vésicules de sécrétion fusionnent avec la membrane plasmique, le contenu fluorescent est libéré dans le milieu extérieur, provoquant une signature caractéristique – une augmentation soudaine de l'intensité de fluorescence et diffusion du contenu fluorescent dans le milieu extérieur – suivie d'une disparition rapide du signal de fluorescence. Cette signature est due à la combinaison de plusieurs phénomènes :

- La neutralisation du pH dans la vésicule de sécrétion acide provoquant une exaltation de la fluorescence,
- Le rapprochement du contenu fluorescent de l'interface verre/milieu dans laquelle l'intensité de l'onde évanescente est plus importante, provoquant une augmentation de la fluorescence également,
- La diffusion du contenu vésiculaire dans le milieu extérieur, menant à une diminution de la fluorescence jusqu'à disparition complète du signal.

Ces événements seront nommés événements de libération complète puisque tout le contenu de la vésicule diffuse dans le milieu extérieur . Le nombre d'évènements de libération complète par minute par cellule est diminué par l'inhibition de l'expression de Cdc42 de : $19,6 \pm 3,9$ pour les cellules contrôles, à $9,5 \pm 2,0$ pour les cellules siCdc42-A, et $3,1 \pm 0,9$ pour les cellules siCdc42-C (les marges d'erreurs sont les erreurs standard).

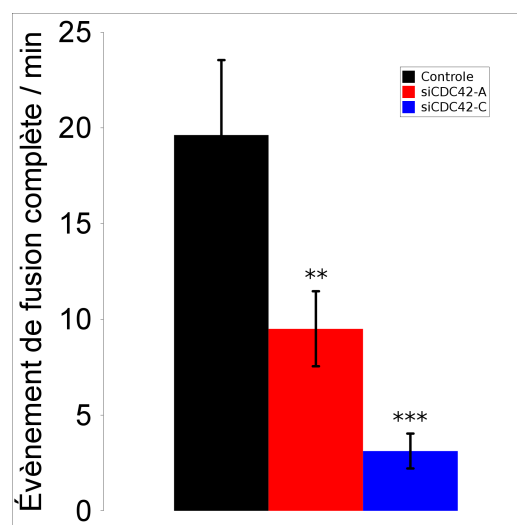


FIGURE 3.5 – Nombre moyen d'évènements de libération complète par minute par cellule des cellules BON transfectées avec NPY-GFP. Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards. $N = 47$ cellules par condition. $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ (ANOVA)

Afin de déterminer quelle étape de l'exocytose est affectée par l'inhibition de l'expression de Cdc42, on observe d'abord le transport et l'arrimage des vésicules de sécrétion à la membrane plasmique.

3.2.2 Cdc42 n'affecte pas le transport, ni l'arrimage des vésicules à la membrane

Nous avons mesuré la densité des vésicules dans la zone subplasmalemmale dans les différentes conditions en utilisant l'imagerie à onde évanescente. La densité de vésicules dans les cellules contrôles n'est pas affectée par l'inhibition de Cdc42 (voir FIGURE 3.2.2 page ci-contre). Ce résultat indique que le transport depuis le trans-Golgi jusqu'à la membrane plasmique sur les micro-tubules n'est pas affecté par Cdc42. Ces observations contredisent les résultats trouvés par *Tsuboi et al.* qui observent une augmentation de la formation de vésicules lorsqu'ils sur-expriment un mutant actif de Cdc42 et une diminution de la densité des granules dans la zone subplasmalemmale [Sato et al., 2012].

Nous avons également caractérisé le mouvement des vésicules en effectuant un suivi individuel des trajectoires. Les périodes d'immobilisations sont ensuite identifiées. On peut alors déterminer un temps caractéristique d'immobilisation qui renseigne sur la capacité des vésicules à s'arrimer à la membrane plasmique (voir FIGURE 3.2.2 page suivante). La distribution de ces temps d'immobilisation n'est pas modifiée. Ce résultat indique que Cdc42 n'intervient pas dans l'arrimage des vésicules de sécrétion à la membrane plasmique.

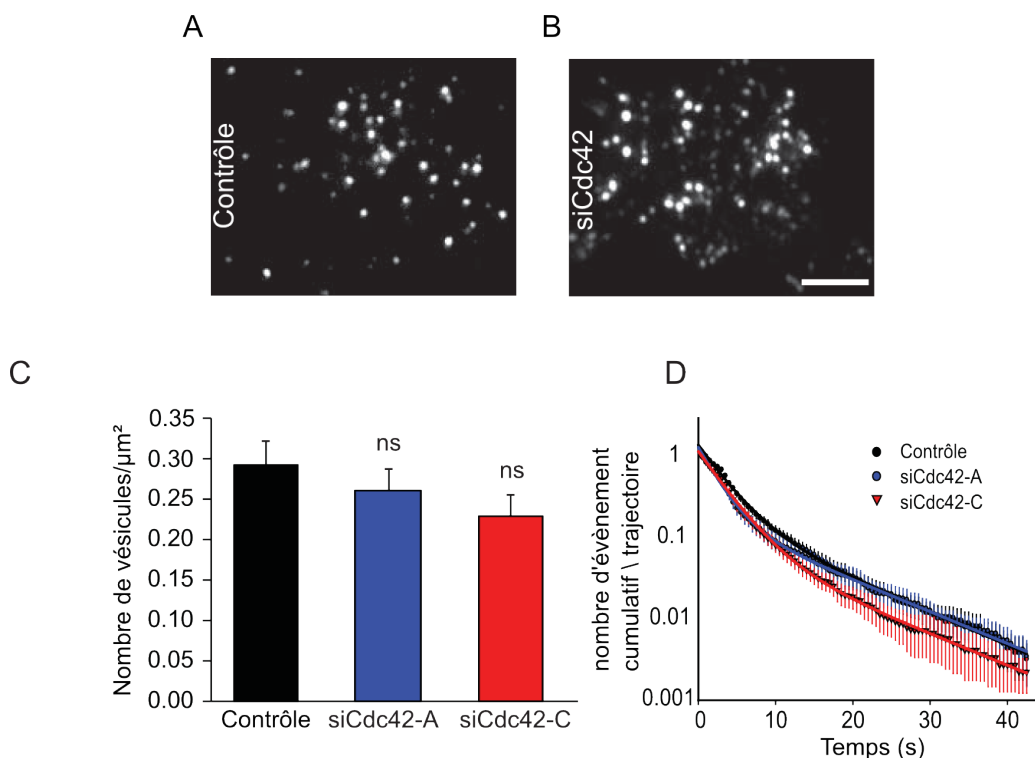


FIGURE 3.6 – **A)** Image à onde évanescente d’une cellule BON contrôle transfectée avec NPY-GFP. La densité de vésicules est de 0,27 vésicules par micro-mètre carré. **B)** Image à onde évanescente d’une cellule BON siCdc42-A. La densité de vésicules est de 0,26 vésicules par micro-mètre carré. **C)** Quantification de la densité des vésicules. La densité n’est pas affectée par l’inhibition de l’expression de Cdc42. La taille de l’empreinte d’adhésion des cellules non plus. **D)** Un traitement informatique utilisant MIA et *Metamorph* a permis de suivre les trajectoires individuelles des vésicules. Le coefficient de diffusion D_{xy} instantané est calculé pour chaque point de la trajectoire en utilisant un algorithme d’intervalle roulant. Les fragments de trajectoire ayant un $D_{xy} < 5.10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ sont considérés comme des périodes d’immobilisation. Le graphique représente la survie du temps d’immobilisation, c’est-à-dire pour chaque durée d’immobilisation donnée, le nombre d’occurrences de plages d’immobilisation aussi longue ou plus longue par trajectoire. Contrôle : $N = 19$ cellules, 2978 trajectoires; siCdc42-A : $N = 18$ cellules, 2283 trajectoires; siCdc42-C : $N = 17$ cellules, 2817 trajectoires. Les données représentent 3 expériences indépendantes. Les courbes ont été ajustées avec un double exponentiel donnant accès aux temps caractéristiques d’immobilisation. L’immobilisation n’est pas altérée par l’inhibition de l’expression de Cdc42.

3.2.3 Cdc42 affecte la capacité de libération des vésicules de sécrétion

Le transport et le recrutement des granules ne sont pas affectés, mais la sécrétion diminue lors de l'inhibition de l'expression de Cdc42. L'étape affectée par Cdc42 est donc au cours de l'exocytose elle-même.

Afin de déterminer si la capacité individuelle des vésicules de sécrétion était affectée par l'inhibition de l'expression de Cdc42, nous avons utilisé l'ampérométrie à fibre de carbone. Nous avons chargé les vésicules de cellules BON avec de la sérotonine. La sérotonine est une mono-amine oxydable. Les cellules sont ensuite observées au microscope. Une électrode de carbone est placée au contact de la membrane plasmique, une électrode de référence baigne dans le milieu d'observation et les cellules sont stimulées par perfusion de ionomycine en présence de 2,5mM de calcium. Lorsqu'une vésicule fusionne avec la membrane plasmique, la sérotonine est libérée et s'oxyde au contact de l'électrode de carbone et génère un courant qui est mesuré et enregistré, donnant une série de pics. Chaque pic correspond à un événement unique de fusion d'une vésicule de sécrétion. On peut alors analyser les pics pour obtenir différentes informations :

- l'intensité maximum : ce paramètre qui est le maximum de la courbe du pic donne une information sur le flux maximum de sérotonine.
- la charge : ce paramètre correspond à l'intégrale de la courbe du pic et donne une information sur la quantité totale libérée par la vésicule.
- le flux moyen : ce paramètre correspond à la charge divisée par la durée du pic, et donne une information sur la vitesse à laquelle la vésicule est capable de libérer son contenu.

Environ un tiers des pics possèdent un pied juste avant le pic principal (cf 3.2.3; PPP : Pied Pré-Pic, figure de droite, partie pointillée). Les PPP correspondent à l'ouverture du pore de fusion. C'est seulement lors de l'extension du pore de fusion qu'il y a l'enregistrement du pic proprement dit avec une brusque augmentation du courant, dû à la libération rapide de la

sérotonine contenue dans la vésicule.[Chow et al., 1992]

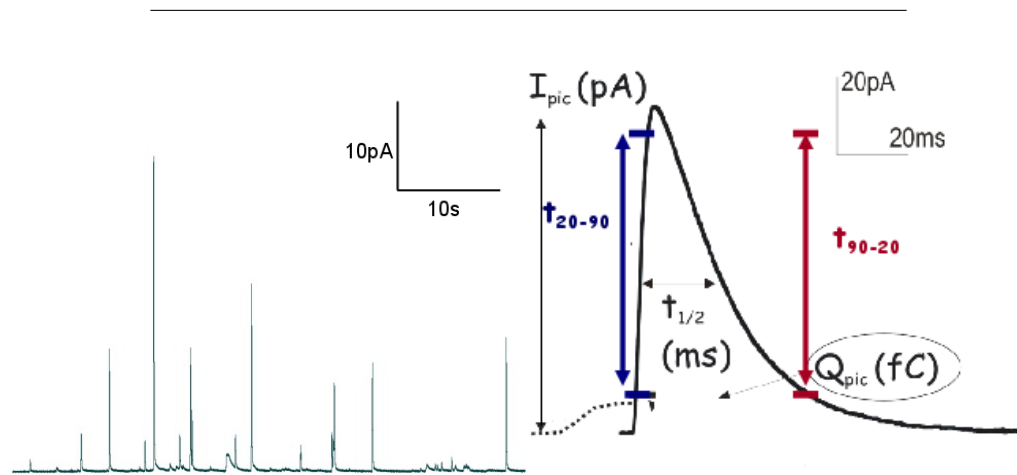


FIGURE 3.7 – À gauche, une trace typique obtenue par ampérométrie sur cellules contrôle BON. Chaque pic correspond à un évènement de fusion. À droite, schéma d'un pic unique. I_{pic} (intensité maximale) correspond au maximum de la courbe. Q (charge) correspond à l'intégrale de la courbe. $Q/t_{20-t_{20}}$ (flux) correspond à l'intégrale divisée par le temps entre 20% du signal maximum (premier marqueur bleu) jusqu'au retour à 20% du signal maximum (deuxième marqueur rouge).

L'inhibition de l'expression de Cdc42 réduit significativement l'intensité maximum moyenne des pics, la charge moyenne et le flux moyen (voir FIGURE 3.2.3 page suivante).

Le phénotype sauvage peut être restauré si on transfecte les cellules siCdc42-A avec un vecteur codant pour une forme résistante au duplex de Cdc42.

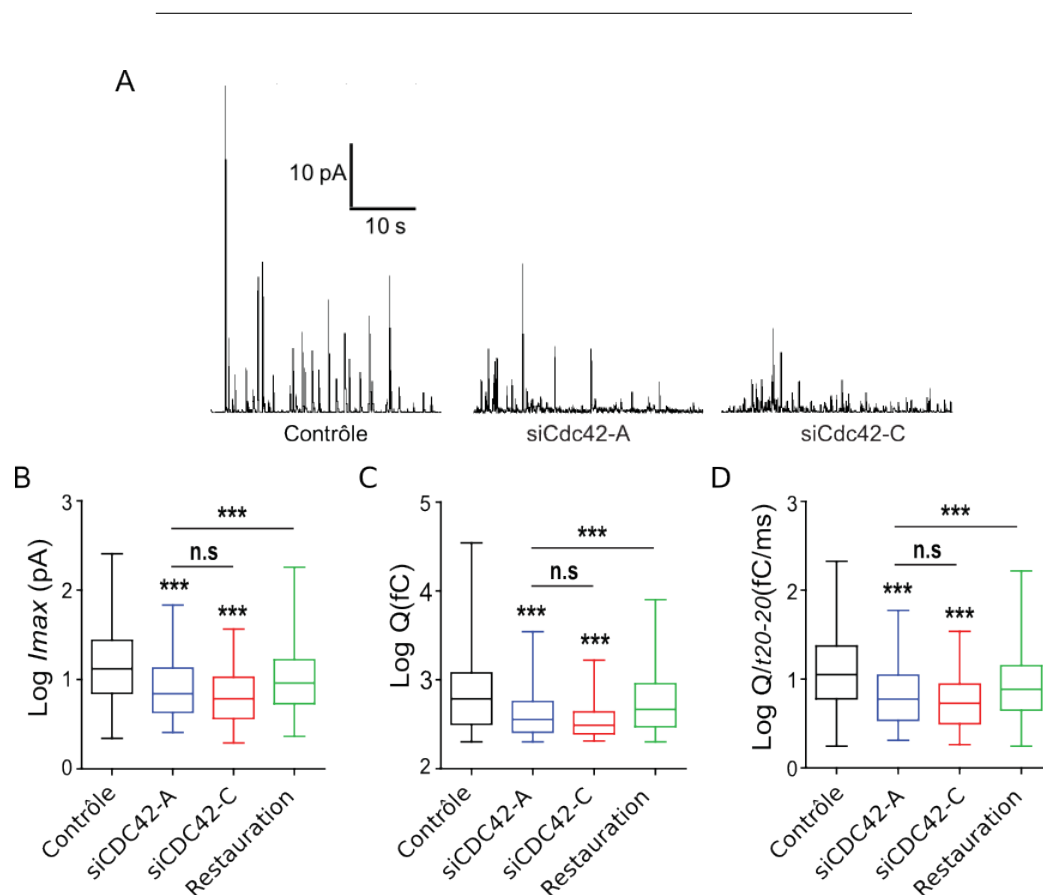


FIGURE 3.8 – **A)** Traces d'ampérométrie caractéristiques de cellules BON stimulées, transfectées avec un duplex contrôle ou inhibant l'expression de Cdc42. **B)** Diagrammes en boîte représentant le logarithme de l'intensité maximale I_{max} , **C)** la charge, **D)** et le flux moyen. Cdc42 joue un rôle dans l'efflux de la sérotonine. Les résultats ont été testés avec un test ANOVA et un post-test de Tukey. Les conditions siCdc42 A et C sont significativement différentes avec $p < 10^{-8}$. La condition de restauration comparée à la condition siCdc42-A donne $p < 2.10^{-4}$. n-s : non significatif. $N = 893$ (contrôle), 208 (si-Cdc42-A), 47 (si-Cdc42-C) et 400 pics (restauration) isolés dans 69 (contrôle), 33 (si-Cdc42-A), 8 (si-Cdc42-C) et 32 cellules (restauration).

Afin de vérifier si cette différence provenait de la capacité des vésicules à libérer leur contenu, ou à la quantité de sérotonine contenue dans les vésicules, nous avons mesuré la taille des vésicules par imagerie super-résolutive STED (*STimulated Emission Depletion microscopy*). Il est nécessaire d'avoir recours

à la microscopie super-résolutive étant donné que le diamètre des vésicules (200 à 250nm) est à la limite de la résolution de la microscopie optique (environ 200nm), et donc que toute diminution de la taille en-dessous de cette limite aurait été artificiellement occultée. La taille des vésicules n'est pas diminuée par l'inhibition de Cdc42 (voir FIGURE 3.2.3).

Nous avons également mesuré la charge de sérotonine tritiée sensible à la présence de réserpine des cellules. La réserpine est une drogue qui bloque les transporteurs vésiculaires de mono-amines, empêchant l'entrée dans les vésicules de sécrétion de la sérotonine. La différence de charge entre des cellules traitées à la réserpine et des cellules non-traitées correspond donc à la charge contenue dans les vésicules. Cette charge n'est pas affectée par Cdc42 (voir FIGURE 3.2.3).

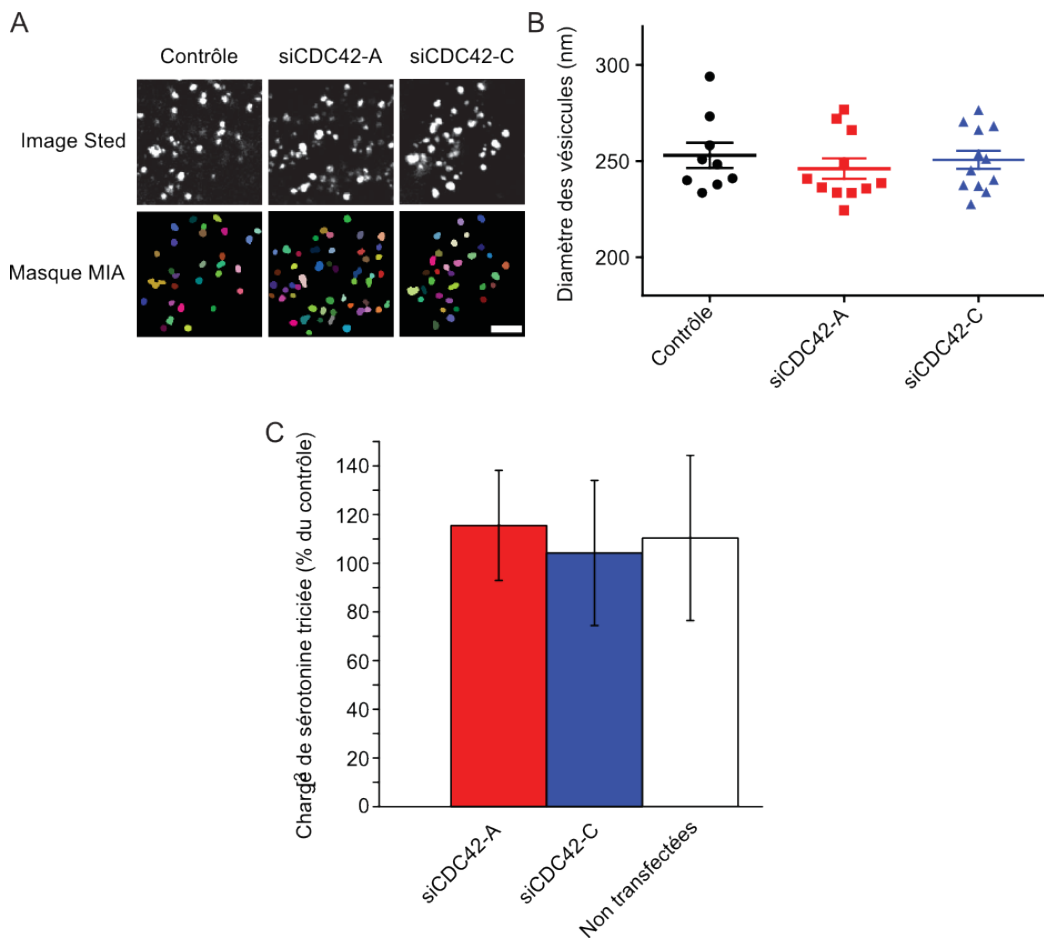


FIGURE 3.9 – **A)** Images STED des vésicules de sécrétion. Les cellules BON ont été électroporées avec un vecteur codant pour NPY-pHluorine et NPY-mRFP, ainsi qu'un duplex siCdc42-A ou siCdc42-C. Trois jours plus tard, les cellules ont été fixées et marquées avec un anticorps primaire anti-GFP, et un anticorps secondaire couplé au marqueur fluorescent atto-532. Les cellules ont été imagées par microscopie STED. Les images ont été segmentées par MIA (images du dessous). 1856 vésicules provenant de 9 cellules contrôle, 2194 vésicules provenant de 11 cellules siCdc42-A et 2268 vésicules provenant de 12 cellules siCdc42-C ont été analysées. Les masques permettent de voir l'identification des vésicules par MIA. Chaque objet identifié a une couleur différente. L'échelle est de $1\mu\text{m}$. **B)** Diagramme en points du diamètre des vésicules. Les diamètres ont été calculés à partir de la surface des objets en supposant une forme circulaire. La taille n'est pas affectée par l'extinction de Cdc42 ($p=0,67$, ANOVA). **C)** Des cellules BON ont été transfectées avec bVMAT1 et un duplex contrôle, siCdc42-A ou siCdc42-C. Après 3 jours, elles ont été incubées à 37°C en présence de $[^3\text{H}]$ sérotonine avec ou sans résérpine $1\mu\text{mol}/\text{dm}^3$, inhibiteur du transporteur vésiculaire des mono-amines. La moyenne ($N=3$ puits par condition) de la quantité de $[^3\text{H}]$ sérotonine chargée par les cellules moins la quantité moyenne mesurée en présence de résérpine est exprimée en pourcentage du contrôle, puis moyennée sur 3 expériences indépendantes (\pm erreur standard). Cdc42 n'intervient pas dans la charge des vésicules.

La quantité de sérotonine libérée par les vésicules lors de chaque événement de fusion est diminuée, mais les vésicules ne sont ni plus petites, ni moins chargées. Cdc42 affecte donc la capacité des vésicules de sécrétion à libérer leur contenu dans le milieu extérieur, indiquant un probable rôle dans l'expansion du pore de fusion.

3.2.4 Cdc42 favorise les événements de libération partielle

Sur les traces siCdc42 A et C, on peut observer la présence de petits événements, à peine plus intenses que le bruit, et de forme anormale (moins de $1,8\text{pA}$, voir D de 3.2.4). Ces signaux peuvent être interprétés comme des pieds isolés (PI) : il pourrait s'agir d'une ouverture du pore de fusion sans expansion, donnant lieu à un événement de libération partielle.

Le nombre de ces pieds isolés dans les conditions siCdc42-A et -C sont fortement augmentés, de même que la proportion de ces évènements par rapports aux pics complets (voir FIGURE 3.2.4).

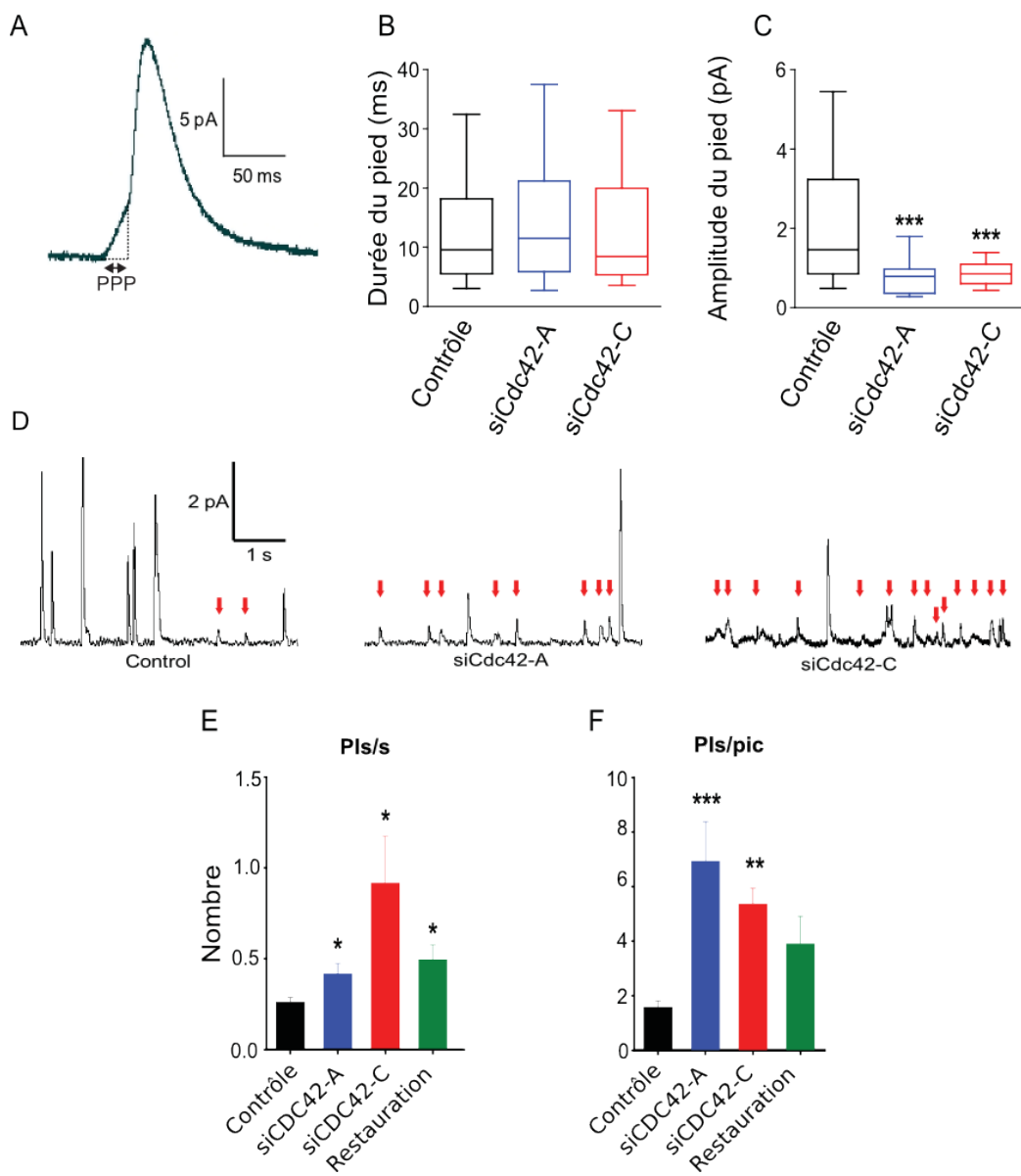


FIGURE 3.10 – **A)** Les pics ampérométriques sont souvent précédés d'un pied de pré-pic (PPP), indiquant l'ouverture du pore de fusion lors de l'exocytose. La forme des PPPs est souvent une « rampe », ce qui suggère que le pore se dilate lentement jusqu'au déclenchement du pic lui-même, qui correspond probablement à la déconstruction de la machinerie de l'exocytose au niveau du cou de la vésicule de sécrétion. Un exemple typique est montré ici. La durée des PPP n'est pas affectée par Cdc42, en revanche, le flux de sérotonine au travers du pore est réduit par l'extinction de Cdc42. **C)** $***p < 0,001$; test de Kruskal-Wallis, suivi d'un post-test de Dunn; $N = 199$ (contrôle), $N = 72$ (siCdc42-A), $N = 45$ (siCdc42-C) PPPs. Les moustaches indiquent le 10ème et le 90ème percentile. **D)** Exemples de traces contenant des événements de petite taille et de forme irrégulière correspondant vraisemblablement à des PPPs non suivis de pics. On appelle ces événements des pieds isolés (PI, flèches rouges). Ils traduisent sans doute des pores qui ne se dilatent pas. L'extinction de l'expression de Cdc42 augmente le nombre de ces PIs (**E)**, ainsi que le rapport entre le nombre de PPPs et le nombre de pics. Ces données ont été analysées sur 45 (contrôle), 21 (siCdc42-A), 5 (siCdc42-C) et 9 cellules (restauration par sur-expression d'un mutant de Cdc42 résistant au duplex siCdc42-A). $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; Test de Kruskal-Wallis suivi par un post-test de Dunn.

Afin de vérifier que ces PIs étaient bien des événements de libération partielle avec formation du pore de fusion, nous avons souhaité montrer par une méthode optique qu'on pouvait montrer l'existence d'évènements de libération partielle.

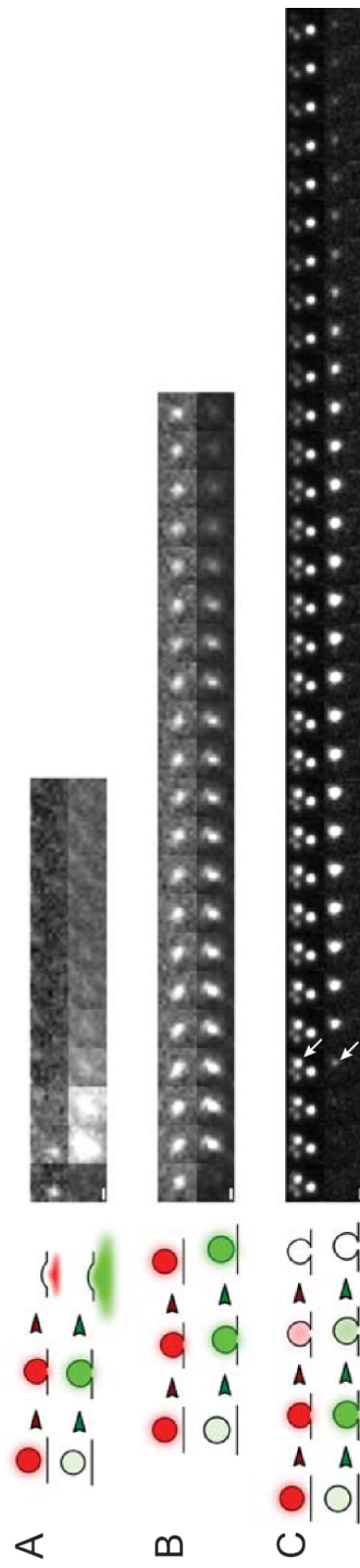
Pour cela, nous avons transfecté les cellules avec deux marqueurs des vésicules : le neuropeptide-Y fusionné à une protéine fluorescente rouge monomérique peu sensible au pH (NPY-mRFP), et le neuropeptide-Y fusionné à une protéine fluorescente verte très sensible aux variations de pH (NPY-pHfluorine). Le pH dans les granules de sécrétion étant acide (5 - 5.5), la pHfluorine est éteinte dans ces conditions. Lors de la formation du pore de fusion, les ions H_3O^+ passent facilement le pore de fusion et neutralisent le pH de la vésicule déclenchant une exaltation de la fluorescence de la pHfluorine.

Une fois le pore de fusion formé, la vésicule peut avoir plusieurs devenir :

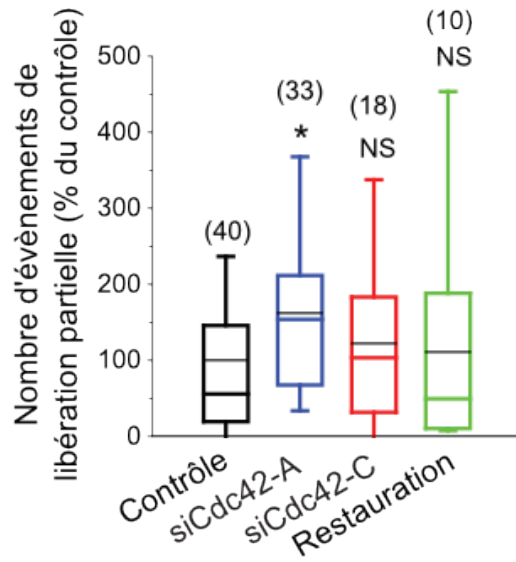
- effectuer une libération complète du contenu avec une dilatation du pore de fusion : les signaux de la mRFP et de la pHfluorine disparaissent

alors rapidement par diffusion du contenu dans le milieu extérieur (voir FIGURE 3.2.1 page 162),

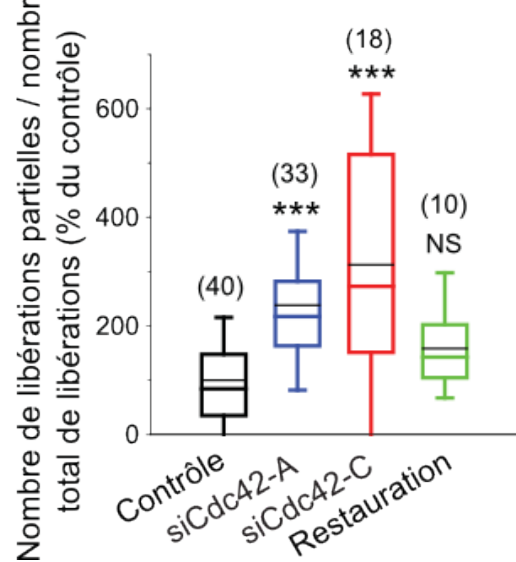
- effectuer une libération partielle avec refermeture du pore de fusion : le signal de la mRFP restera présent, mais le signal de la pHluorine disparaîtra pendant que la vésicule se ré-acidifiera,
 - effectuer une libération partielle avec maintien d'un pore de fusion ouvert : les signaux de la mRFP et de la pHluorine disparaîtront lentement alors que le contenu vésiculaire diffusera lentement au travers du petit pore de fusion.
-



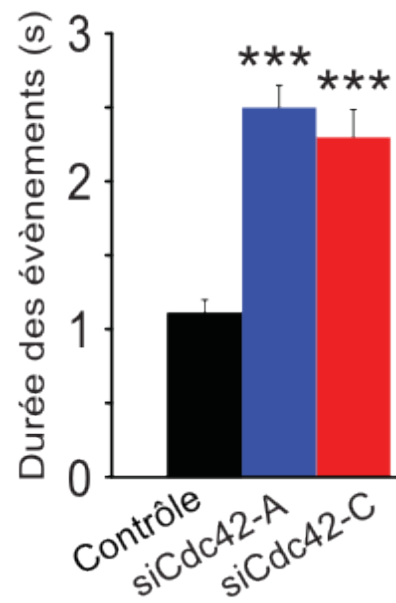
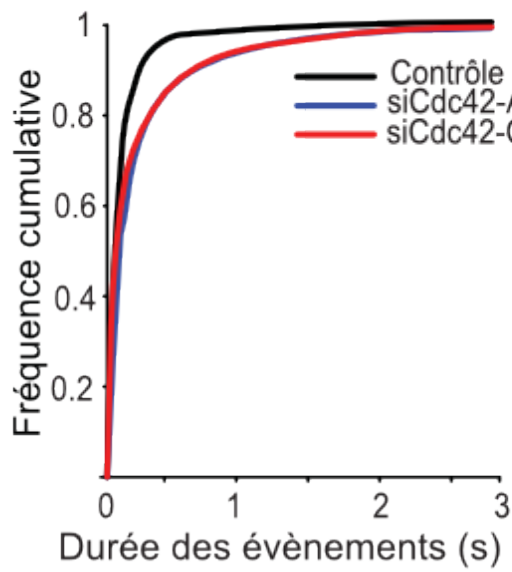
D



E



F



G

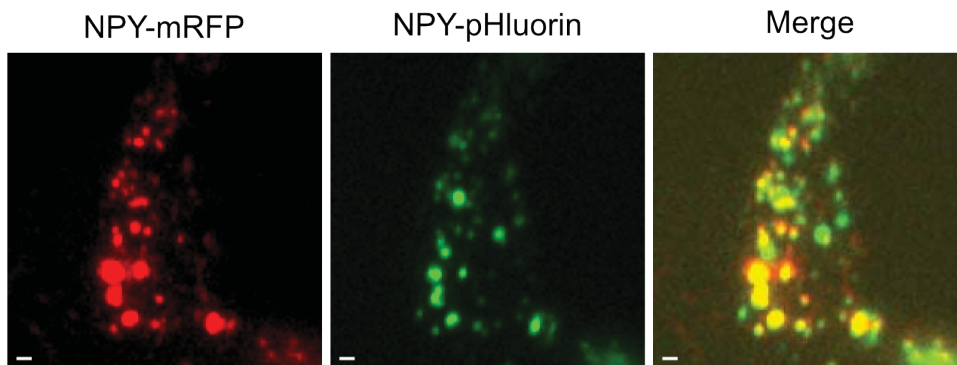


FIGURE 3.11 – **A**) Schémas des différents devenir d'un évènement de fusion, montrant le comportement du NPY-mRFP et du NPY-pHluorine dans les différents cas. Série d'images de vidéo-microscopie à onde évanescente de ces évènements (10Hz) dans le canal rouge (haut) et le canal vert (bas). Échelles : 1 μ m. Dans certains cas, le pore de fusion ne se dilate pas, et NPY-mRFP n'est pas libéré (**B**), ou diffuse lentement au travers du pore (**C**, voir la vésicule fléchée); dans certains cas, le pore se referme, et la vésicule se ré-acidifie. Ceci est indiqué par la lente disparition du signal vert sans modification du signal rouge. L'extinction de l'expression de Cdc42 augmente le nombre d'évènements de libération partielle (**D**), et la proportion d'évènements de libération partielle parmi les évènements de libération (**E**). Ces deux effets peuvent être récupérés par la sur-expression d'un vecteur Cdc42 résistant au duplex siCdc42-A. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; NS : non significatif; tests de Kruskal-Wallis, avec post-test de Dunn. **F**) À gauche, distribution cumulative de la durée du signal vert lors d'évènements de fluorescence, pris entre l'apparition du signal vert et le retour à moins de 20% du bruit de fond, représentant la durée de l'évènement. À droite, la moyenne des durées (\pm erreur standard). 714 (contrôle), 925 (siCdc42-A) et 541 (siCdc42-C) évènements ont été analysés. Le nombre de cellules est indiqué entre parenthèse pour (**D**) et (**E**). Les moustaches indiquent le 10ème et le 90ème percentiles. La ligne noire fine indique la moyenne.

Cette technique permet de différencier les évènements de libération complète avec élargissement du pore de fusion des évènements de libération partielle au cours desquels le pore de fusion reste contraint. On observe une augmentation du nombre d'évènements de libération partielle après traitement par les duplex siCdc42-A et -C. La proportion d'évènements de libération partielle par rapport au nombre de libérations totales est elle aussi fortement

augmentée (voir FIGURE 3.2.4 page 174).

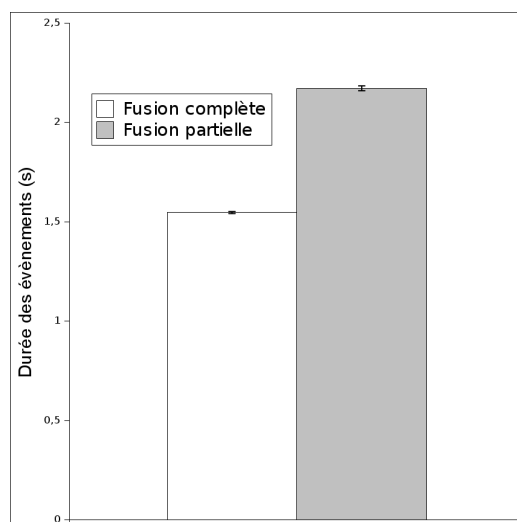


FIGURE 3.12 – La durée des évènements est mesurée entre l'apparition du signal de la pHluorine et le retour du signal à moins de 20% du signal du bruit de fond. Les évènements de libération partielle ont une durée plus longue due au fait qu'une partie du contenu de la vésicule est retenue dans la vésicule, alors que dans les évènements de libération complète, le signal disparaît rapidement lors de la diffusion du contenu de la vésicule dans le milieu extérieur.

Afin de s'affranchir de toute catégorisation arbitraire des évènements, nous avons également mesuré le temps des évènements de libération dans les différentes conditions. Ce temps correspond au temps qui s'écoule entre l'apparition du signal vert au moment de la fusion et le retour du signal à moins de 20% du bruit de fond local. On constate un allongement des évènements de fusion dans les conditions siCdc42-A et -C. De plus, nous avons mesuré les temps des évènements pour les évènements classés libération complète et pour les évènements classés libération partielle. On observe que les évènements de libération partielle sont en moyenne plus longs que les évènements de libération complète (voir FIGURE 3.2.4).

Les techniques d'ampérométrie et d'imagerie à onde évanescente n'observent pas exactement la même chose : tandis que l'ampérométrie mesure le

contenu libéré des vésicules, l'imagerie à onde évanescente permet de mesurer le contenu des vésicules retenu. Ainsi, un signal court en ampérométrie (faible libération) correspond à un événement long en imagerie à onde évanescente (rétention importante). Le nombre d'événements longs, correspondant à des événements de libération partielle est augmenté lorsqu'on inhibe l'expression de Cdc42, ce qui confirme que les PPPs observés sur les traces d'ampérométrie sont effectivement des événements de libération partielle.

3.2.5 Cdc42 n'affecte pas la probabilité de fusion

Cdc42 affecte la capacité d'élargissement du pore de fusion, mais affecte-t-elle également la probabilité de formation du pore de fusion ?

Si on compte le nombre de pics de grande taille ($>10\text{pA}$), le nombre d'événements est fortement diminué par l'inhibition de l'expression de Cdc42. Si on prend en compte des pics de plus petite taille ($>3\text{pA}$), la réduction est moins forte. Si on prend en compte des pics très petits ($>1,8\text{pA}$), la différence est à peine significative. Enfin, si on prend en compte les PPPs qui sont des événements de libération partielle, il n'y a plus de différence significative entre les cellules contrôle et les cellules siCdc42-A ou -C (voir [FIGURE 3.2.5](#) page suivante). Cdc42 n'affecte donc pas la probabilité de formation du pore de fusion.

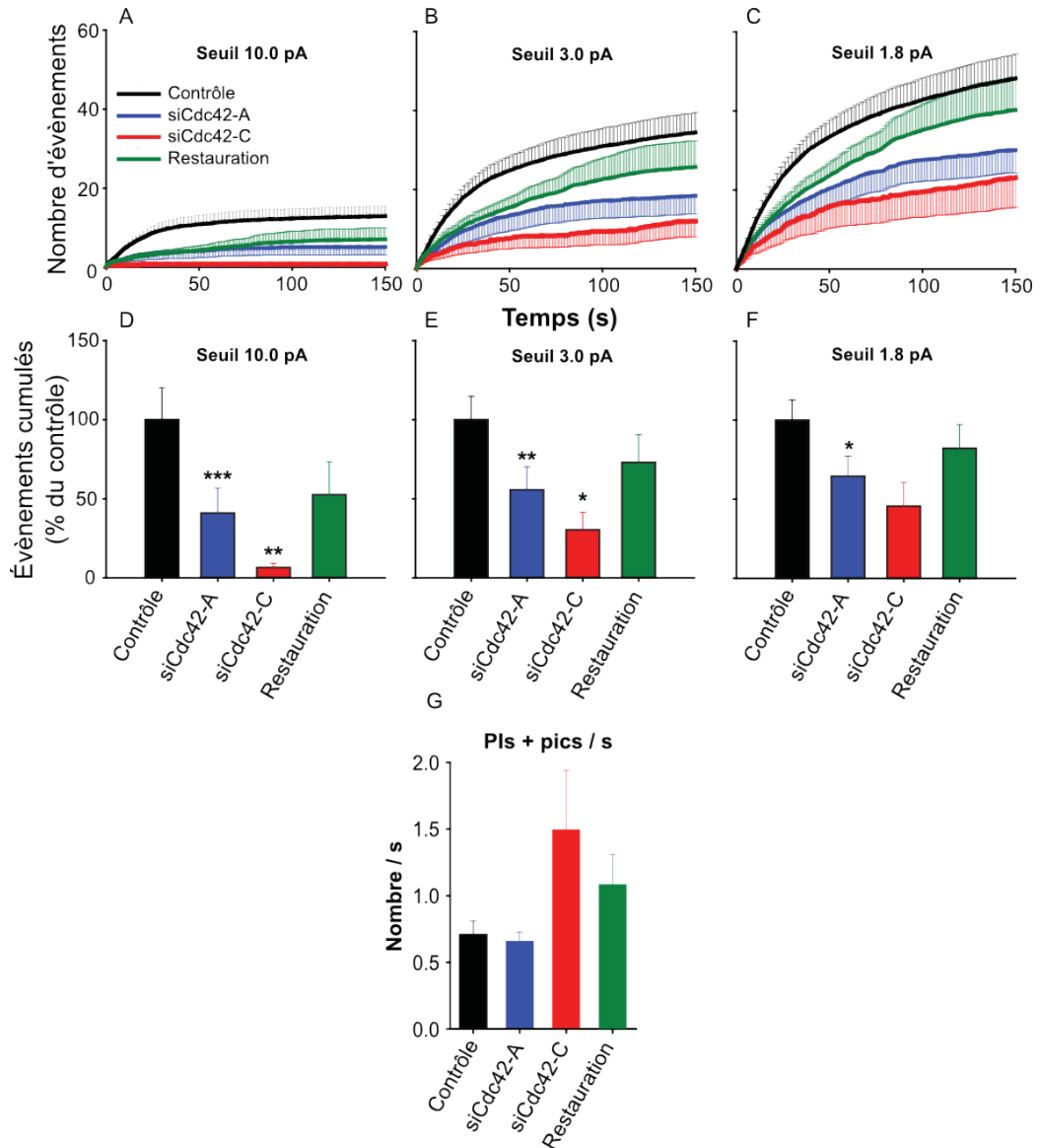


FIGURE 3.13 – Nombre cumulatif de pics ampérométriques dans des cellules BON transfectées avec un duplex contrôle, siCdc42-A ou siCdc42-C. Le phénotype sauvage peut être restauré dans les conditions siCdc42-A par sur-expression d'un vecteur Cdc42 résistant. Les pics pris en compte sont ceux dont l'intensité dépasse 10pA (A), 3pA (B), et 1,8pA. D-F) Nombre d'évènements cumulés exprimés en pourcentage du contrôle pris à t=100s. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Kruskal-Wallis test). $N = 92$ (contrôle), $N = 43$ (si-Cdc42-A), $N = 10$ (si-Cdc42-C) et $N = 40$ cellules (restauration).

Il apparaît donc que Cdc42 régule uniquement l'extension du pore de fusion, mais aucune des étapes précédente au cours de l'exocytose : ni le transport, ni l'arrimage à la membrane plasmique, ni la probabilité de fusion ne sont affectés.

3.2.6 Le recrutement de Cdc42 à la membrane plasmique et le remodelage du cortex d'actine

Nous avons souhaité vérifier si les effets de Cdc42 étaient dus à son recrutement à la membrane plasmique. Nous avons sur-exprimé une construction constituée de la fusion de Cdc42 et de la GFP (Cdc42-GFP) dans les cellules BON, et avons suivi son signal lors de la stimulation par imagerie à onde évanescente. Le signal n'augmente pas lors de la stimulation. Nous avons souhaité vérifier également s'il y avait un enrichissement local de Cdc42 au site de l'exocytose. Nous avons donc sur-exprimé NPY-mRFP et Cdc42-GFP dans les cellules BON. Les cellules ont été stimulées par perfusion locale de ionomycine et des vidéos ont été enregistrées dans le canal rouge et vert simultanément à l'aide d'un diviseur d'image. Les vidéos ont ensuite été alignées et lors de chaque évènement d'exocytose détecté dans le canal rouge par la diffusion du NPY-mRFP dans le milieu extérieur, la concentration locale au site de l'exocytose a été mesurée par le rapport entre le signal de Cdc42-GFP au site de l'exocytose et le signal dans son environnement direct. La moyenne de ce rapport est de 1 suggérant qu'il n'y a pas d'enrichissement local de Cdc42-GFP.

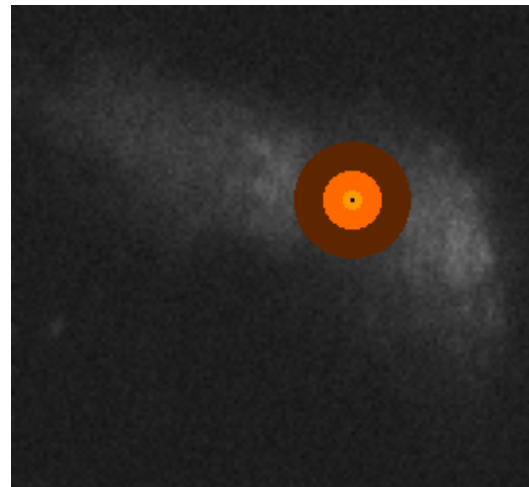
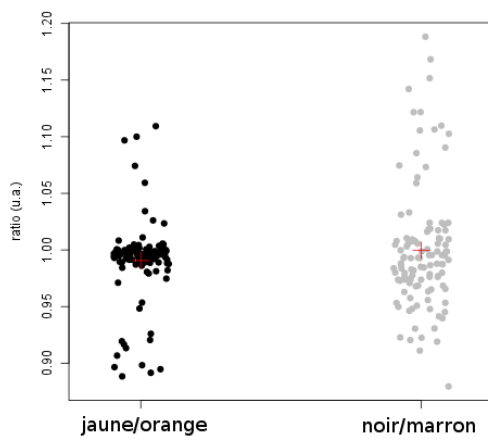
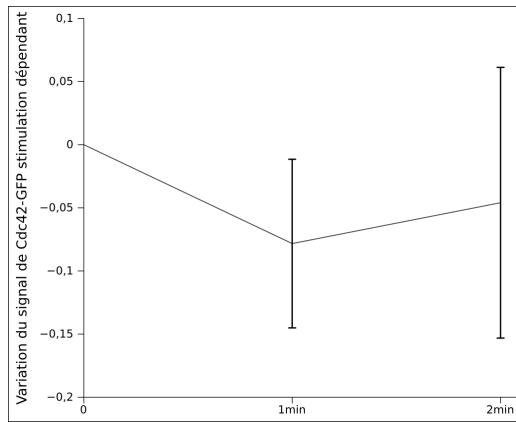
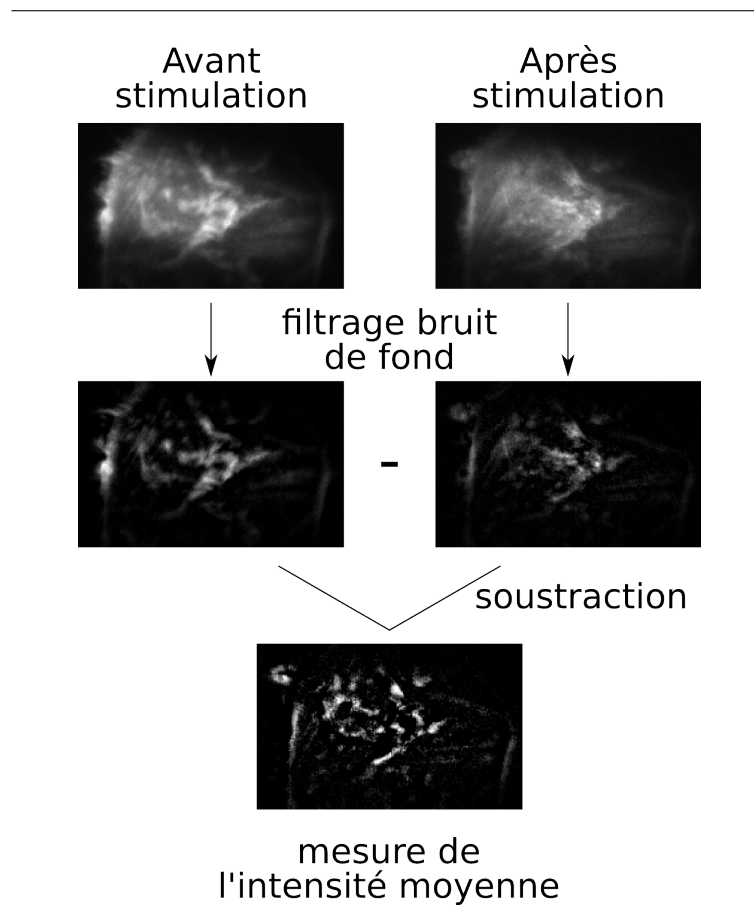


FIGURE 3.14 – **Haut**) Des cellules BON ont été transfectées avec Cdc42-GFP. Des cellules ont été stimulées par perfusion locale de ionomycine, observées par imagerie à onde évanescente, et comparées à un groupe contrôle non stimulé perfusées avec du milieu de Locke. Les signaux de Cdc42-GFP a été enregistré avant la perfusion (t_0), puis 1min et 2min après le début de la perfusion. Ces signaux ont été exprimés en pourcentage du signal à t_0 , et on leur a soustrait le signal des contrôles. Le résultat montré ici est la variation stimulation dépendante du signal de Cdc42-GFP (les barres d'erreurs sont les erreurs standard). Cdc42 ne semble pas recruté à la membrane plasmique. ($N = 10$ cellules contrôle, $N = 10$ cellules stimulées). **Bas**) Des cellules BON ont été transfectées avec Cdc42-GFP et NPY-mRFP. Ces cellules ont été stimulées et observées par imagerie à onde évanescente dans les deux canaux rouge et vert simultanément à l'aide d'un diviseur d'image. La concentration locale de Cdc42-GFP a été déterminée au site de chaque évènement d'exocytose. Quatres zones d'intérêts ont été définies : le pixel au centre de l'évènement d'exocytose (pixel noir), les cercles concentriques de 10 pixels de diamètre (jaune), 30 pixels de diamètre (orange), et 60 pixels de diamètre (marron). Les différentes concentrations locales pour chaque évènement d'exocytose sont représentées dans le diagramme en points (gauche). La concentration locale a été déterminée en calculant deux rapports : l'intensité du pixel noir sur l'intensité moyenne du cercle marron (points noirs) et l'intensité moyenne du cercle jaune sur l'intensité moyenne du cercle orange. Les croix rouges représentent les moyennes. La moyenne des concentrations locales est de 1 ce qui suggère qu'il n'y a pas d'enrichissement local de Cdc42-GFP au site de l'exocytose. À droite, une cellule BON exprimant Cdc42-GFP observée par imagerie à onde évanescente. Un exemple des différents cercles de mesure est représenté. Échelle : 1 pixel mesure 102,3nm. Le cercle marron représente 6,1 μ m.

Nous avons également mesuré la modification du cytosquelette lors de la stimulation dans les différentes conditions. Nous avons transfecté les cellules BON avec Lifeact-GFP qui marque les filaments d'actine, et nous les avons traitées avec un duplex contrôle ou siCdc42-A ou -C. Nous avons observé le cortex d'actine par imagerie à onde évanescente avant et après 1min de stimulation par perfusion locale de ionomycine. Nous avons soustrait le bruit local de ces images par une méthode de fenêtre glissante, soustrait les images avant / après pixel par pixel. Nous avons alors mesuré l'intensité moyenne de l'image résultante. Le signal devrait être d'autant plus haut que de nouvelles

structures d'actine sont apparues. Cette analyse n'a permis de révéler aucune différence entre les différentes conditions.



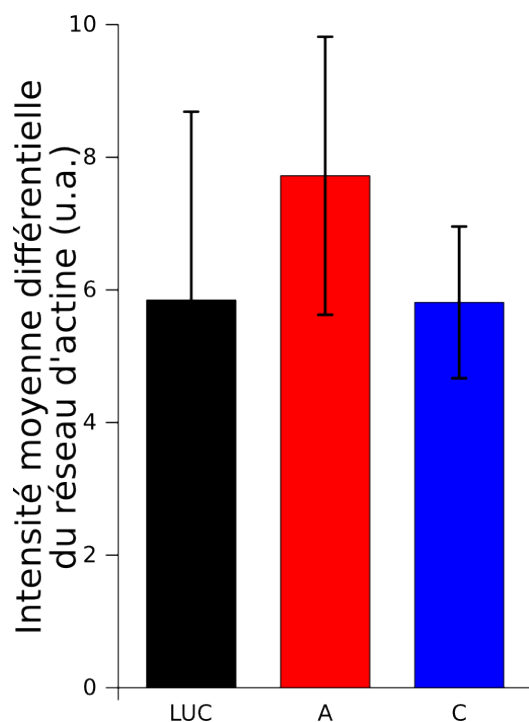


FIGURE 3.15 – Des cellules BON ont été transfectées avec Lifeact-GFP et NPY-mRFP et un duplex contrôle, siCdc42-A ou -C, et observées en imagerie à onde évanescente. Une image a été prise avant et après 1min stimulation par perfusion locale de ionomycine. Le bruit des images a été soustrait par une méthode de fenêtre glissante. L'image avant stimulation a été soustraite pixel à pixel de l'image après stimulation. L'intensité moyenne de l'image résultante a été mesurée. Ce processus d'analyse est illustré en haut. La moyenne des intensités moyennes de la modification du cortex d'actine est représentée en bas. Cette valeur n'est pas modifiée par l'inhibition de l'expression de Cdc42.

3.2.7 La tension de la membrane plasmique est diminuée par l'extinction de l'expression de Cdc42

Afin de déterminer le mécanisme par lequel Cdc42 régule la tension de la membrane, nous avons effectué des mesures de tension de membrane des cellules BON au repos ou stimulées et transfectées avec un duplex contrôle, siCdc42-A ou siCdc42-C. Nous avons utilisé un microscope équipé d'une pince

optique. Une bille recouverte de concavaline-A est placée au centre du piège optique, puis est amenée au contact de la membrane plasmique de la cellule étudiée. Dans les conditions stimulées, les cellules sont perfusées localement avec de la ionomycine et 2,4mM de Ca^{2+} . Après un temps d'attachement de la bille à la membrane plasmique, et à l'aide de la platine mobile, un tube de membrane est tiré (voir 3.2.7 A). La tension de la membrane exerce une force sur la bille, comparable à celle d'un ressort. Cette force décale la bille du centre du piège optique. La force exercée par le tube sur la bille varie avec la racine carré de la tension de la membrane plasmique effective σ_{eff} . La tension de la membrane effective est la somme de deux composantes : la tension de la bicouche lipidique σ , et l'énergie d'adhésion au cytosquelette W_0 .

$$F \sim \sqrt{\sigma_{eff}} = \sqrt{\sigma + W_0} \quad (3.1)$$

La technique donne donc accès à la tension effective. Il n'existe pas de méthode connue pour déterminer directement la tension σ . Cependant ces mesures nous ont permis de déterminer que Cdc42 n'affecte pas la tension effective de la membrane plasmique au repos (voir FIGURE 3.2.7 page suivante). En revanche, l'inhibition de l'expression de Cdc42 diminue significativement la tension effective de la membrane dans les conditions stimulées. Il y a donc une corrélation entre la tension de la membrane effective et la dilatation du pore de fusion (voir FIGURE 3.2.7 page suivante).

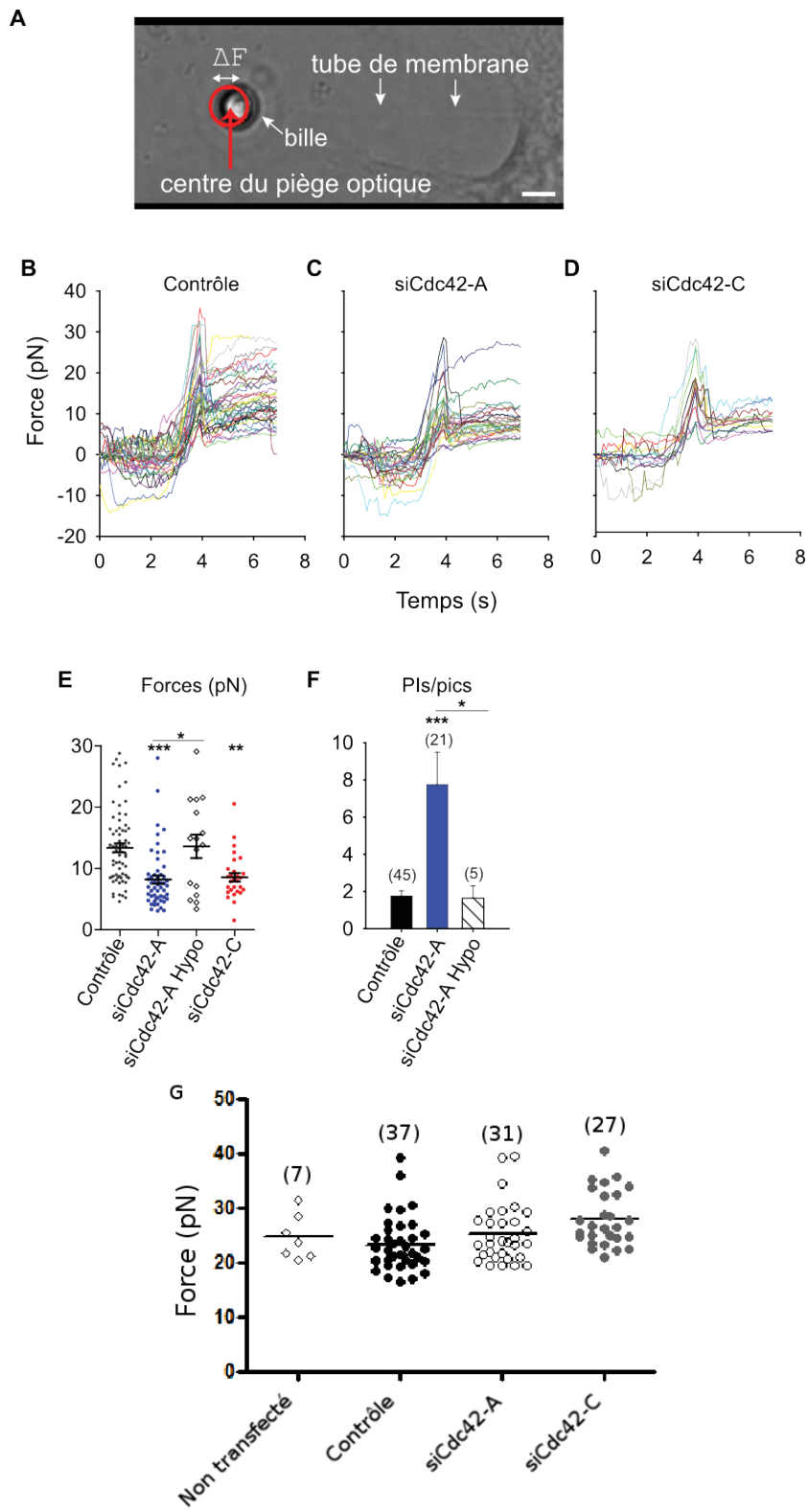


FIGURE 3.16 – **A)** Une bille recouverte de concanavoline-A est piégée dans le piège optique, puis amenée au contact de la membrane plasmique d'une cellule qui adhère à la bille. Un tube de membrane est tiré, exerçant une force de rappel sur la bille proportionnelle à la racine carré de la tension effective de la membrane plasmique. **B-D)** Tracé de la force en fonction du temps en conditions stimulées mesuré dans : 39 cellules contrôle (**B**), 29 cellules siCdc42-A (**C**), 13 cellules siCdc42-C (**D**). **E)** Diagramme en points des forces mesurées entre les plateaux (entre 5s et 7s des traces des forces). L'inhibition de l'expression de Cdc42 diminue la force et donc la tension effective de la membrane plasmique. La tension de la membrane peut être restaurée en baignant les cellules dans un bain hypoosmotique (250mosmol; siCdc42-A Hypo). La tension a été mesurée dans 68 (contrôle), 52 (siCdc42-A), 16 (siCdc42-A Hypo) et 28 (siCdc42-C) cellules. **F)** Quotient du nombre de pieds isolés (PIs) sur le nombre de pics mesurés sur des cellules traitées de la même façon que pour la figure (**E**). La restauration de la tension de la membrane plasmique permet une restauration de l'expansion du pore de fusion. * $p < 0.05$, ** $p < .01$, *** $p < 0.001$, test de Kruskal-Wallis. **G)** Diagramme en point montrant la force exercée par la tension de la membrane plasmique dans des cellules BON au repos non transfectées, ou transfectées avec un duplex contrôle, siCdc42-A ou siCdc42-C. Cdc42 n'affecte pas la tension de la membrane au repos. Le nombre de cellules mesurées est indiqué entre parenthèses au dessus des nuages de points.

3.2.8 La diminution de la tension de la membrane mime les effets de l'extinction de l'expression de Cdc42

Pour montrer que le mécanisme de l'action de Cdc42 sur la dilatation du pore de fusion passe bien par la membrane plasmique, nous avons restauré la tension de la membrane diminuée par l'inhibition de l'expression de Cdc42 transfectée par le duplex siCdc42-A en les incubant dans un milieu d'observation hypoosmotique. Le milieu hypoosmotique restaure la tension de la membrane à une valeur similaire à celle de cellules contrôle dans un milieu isotonique; cette restauration s'accompagne également d'une diminution de la proportion du nombre d'évènements de libération partielle représentée par le rapport PPPs/pics (voir FIGURE 3.2.7 page ci-contre E et F).

Nous avons également diminué la tension de la membrane en utilisant de

la blebbistatine. La blebbistatine est une drogue qui inhibe le fonctionnement de la Myosine II, et provoque une chute de la tension de la membrane plasmique des cellules BON stimulées. Lorsque les cellules BON sont traitées avec le blebbistatine, le nombre d'évènements de libération complète diminue au profit des évènements de libération partielle augmentant fortement leur proportion (voir FIGURE 3.2.8).

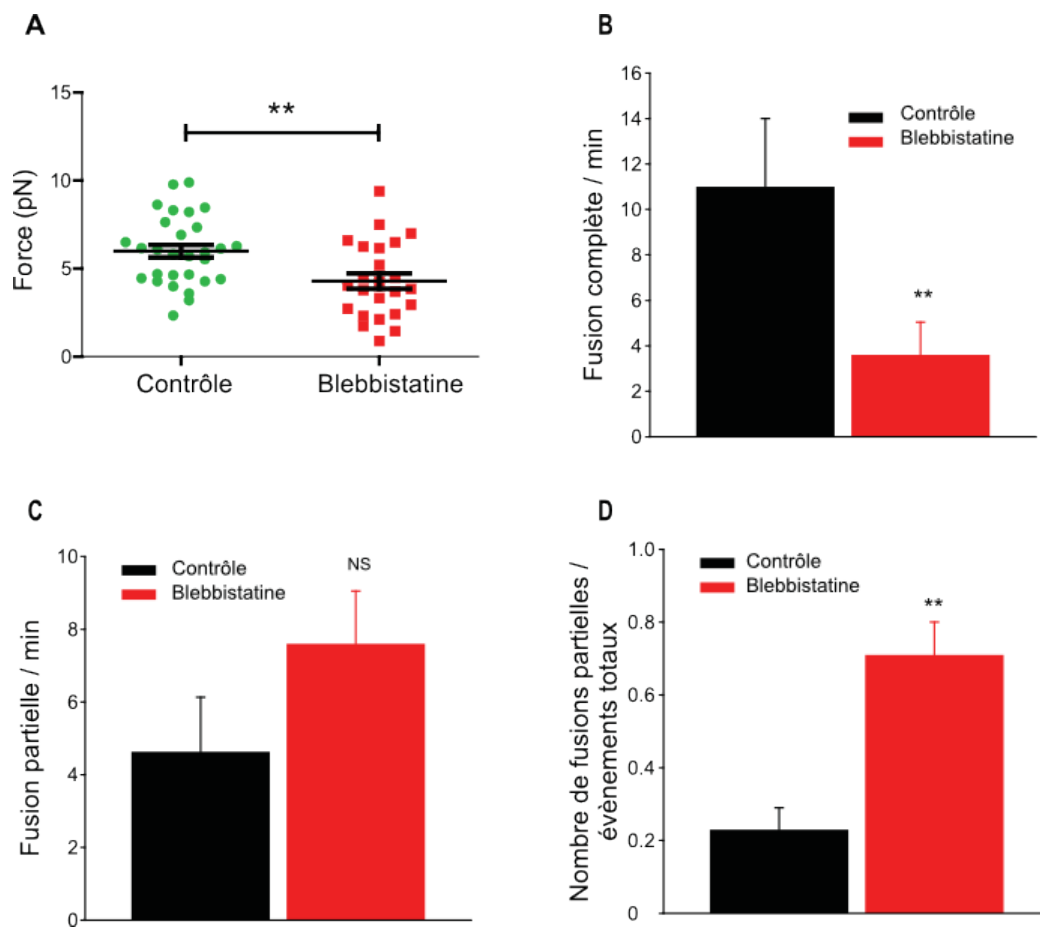


FIGURE 3.17 – **A)** Les cellules BON ont été traitées avec 50 μ M de blebbistatine ou une dose équivalente de DMSO pour les cellules contrôle pendant 10 à 30 minutes. Des mesures de force utilisant le même protocole que celui de la FIGURE 3.2.7 page 186 ont été effectuées en conditions stimulées avec une perfusion locale de ionomycine. **B-D)** Des cellules BON exprimant NPY-mRFP et NPY-pHfluorine ont été traitées avec 50 μ M de blebbistatine (rouge) ou une dose équivalente de DMSO (noir). Les évènements d'exocytose ont été quantifiés comme précédemment (voir section 3.2.4 page 170). On observe une diminution du nombre d'évènements de libération complète (**B**), une augmentation non significative du nombre d'évènements de fusion partielle (**C**), et une forte augmentation de la proportion d'évènements de libération partielle (**D**), mimant les effets de l'inhibition de l'expression de Cdc42. La moyenne (\pm erreur standard) est donnée pour $N = 16$ (Contrôle) et $N = 15$ (Blebbistatine) cellules. $**p < 0.01$. Test de Mann-Whitney.

3.3 Discussion

3.3.1 Cdc42 dilate le pore de fusion

Cdc42 joue un rôle dans l'exocytose, puisqu'il favorise la sécrétion [Gasman et al., 2004, Bader et al., 2004] et l'inhibition de son expression diminue l'exocytose [Malacombe et al., 2006b] ainsi que le nombre d'évènements de libération complète (voir section 3.2.1 page 162) [Sato et al., 2012]. Cependant, Cdc42 n'affecte ni le transport, ni l'arrimage des vésicules (voir section 3.2.2 page 164), ni la probabilité de fusion, *i.e.* ni dans l'amorce de la fusion, ni dans la formation du pore de fusion (voir section 3.2.5 page 178).

L'inhibition de l'expression de Cdc42 diminue les capacités de libération du contenu des granules mesurées par ampérométrie (voir section 3.2.3 page 166). De plus, l'inhibition de Cdc42 augmente le nombre de PIs sur les traces d'ampérométrie. Nous avons confirmé que ces PIs étaient des évènements de libération partielle grâce à l'imagerie à onde évanescente. En effet, on observe une augmentation du nombre d'évènements de libération partielle mesurées à l'aide du NPY-pHfluorine (voir section 3.2.4 page 170).

Il serait intéressant d'utiliser le couplage entre l'imagerie à onde évanes-

cente et l'ampérométrie que nous avons développé (voir chapitre 4 page 209) afin d'avoir une caractérisation très précise des événements de libération. En effet, l'ampérométrie permet la mesure du contenu libéré par la vésicule, alors que l'imagerie à onde évanescente permet de suivre le contenu retenu dans la vésicule. Ce couplage aurait permis d'avoir des informations sur les PIs et la refermeture du pore, et de répondre à certaines questions : les PIs successifs correspondent-ils à plusieurs ouvertures successives d'un même pore de fusion ? y a-t-il une différence de libération du contenu basé sur la taille lors de la libération partielle (basée sur la différence de taille entre le NPY-GFP et la sérotonine) ? Cependant, la technique n'est pas encore suffisamment robuste pour être utilisée.

Ces résultats indiquent que Cdc42 favorise la dilatation du pore de fusion.

3.3.2 Optimisation de la détection d'évènements de libération partielle par imagerie à onde évanescente

Nous avons utilisé l'ampérométrie et l'imagerie à onde évanescente pour détecter les événements de libération partielle (voir section 3.2.4 page 170). Bien que ces techniques soient très différentes : la face et la surface de la cellule étudiée, la résolution temporelle, la taille des rapporteurs (sérotonine et NPY-pHluorine), la sensibilité sont différentes.

Cependant, lorsqu'on mesure le rapport des événements de libération partielle par rapport au nombre total d'évènements le rapport est de $\sim 0,6$ pour l'imagerie à onde évanescente (libération partielle / libération totale), alors qu'il est de $\sim 1,8$ pour l'ampérométrie (PIs / pics). Ceci suggère que l'imagerie à onde évanescente est moins sensible que l'ampérométrie.

Cette différence de sensibilité ne vient probablement pas de la sensibilité au nombre de molécules qui traversent le pore de fusion.

En effet, si on calcule le nombre de molécules nécessaires à la détection d'un signal dans les deux techniques on obtient les résultats suivants :

Ampérométrie : la durée moyenne d'un pied isolé est d'environ 10ms. Son intensité est d'environ 0,1pA. La charge Q (intégrale de la courbe) est

de l'ordre de grandeur de $Q \simeq 1\text{fC}$. Le nombre de molécules oxydées N est donné par l'équation : $Q = neN$, avec n , le nombre d'électrons échangés lors de l'oxydation de la sérotonine ($n = 2$), et e , la charge élémentaire ($e = 1,6E^{-19}\text{C}$). Le nombre de molécules oxydées pour un pied isolé est donc de : $N = \frac{Q}{ne}$, soit $N \simeq 3000$ molécules. La taille de la sérotonine est d'environ 0,8nm, lui permettant de s'échapper du pore de fusion dont le diamètre est compris entre 1 et 10nm.

Imagerie à onde évanescente : afin que la fluorine soit détectée, il est nécessaire de neutraliser le pH de la vésicule de sécrétion, et qu'il passe de 5 à 7. Le volume V de la vésicule est $V = \frac{4}{3}\pi r^3$ avec r le rayon de la vésicule. L'ordre de grandeur du volume est donc de $V \simeq 1E^{-17}\text{L}$. Le nombre d'ions H_3O^+ N contenus dans une vésicule de sécrétion à pH 5 est de $N = cV\mathcal{N}$, avec c la concentration, et \mathcal{N} le nombre d'Avogadro. $N \simeq 50$ ions. La taille de l'ion H_3O^+ est d'environ 0,2nm et peut donc sortir facilement par le pore de fusion.

L'imagerie à onde évanescente implique le passage d'une quantité plus faible d'une molécule plus petite. Elle devrait permettre donc de détecter des pores de fusion plus petits avec des temps de vie inférieurs que l'ampérométrie ne le permet. La différence de sensibilité vient donc probablement de la différence de résolution temporelle. En effet, le temps d'exposition des images prises en imagerie à onde évanescente est de 100ms; une augmentation transitoire du signal de 10ms serait alors perdue dans le bruit. Afin d'augmenter la résolution temporelle, il est nécessaire d'augmenter le rapport signal sur bruit. Pour cela, l'utilisation d'une caméra plus sensible que la nôtre permettrait d'augmenter le signal et donc la fréquence d'acquisition. De plus, l'imagerie à deux couleurs que nous avons utilisée implique l'utilisation simultanée des raies laser à 488nm pour exciter la pHfluorine et à 514nm pour exciter la mRFP. Le laser à 514nm génère du bruit dans le canal vert. L'utilisation d'un filtre opaque à 514nm ou l'absence d'acquisition du canal rouge permettrait de réduire le bruit et d'améliorer la détection. On pourrait également utiliser la bafilomycine pour empêcher la ré-acidification des granules. Cependant, cela empêcherait la détection d'évènements de libération

partielle successifs.

L'optimisation de la détection de libération partielle par imagerie à onde évanescente pourrait être quantifiée par l'utilisation du couplage entre l'imagerie à onde évanescente et l'ampérométrie (voir chapitre 4 page 209), car elle permettrait de quantifier la proportion des événements de libération partielle qu'on détecte dans les deux techniques.

3.3.3 Recrutement de Cdc42

Afin d'obtenir des informations sur le fonctionnement de Cdc42, nous avons cherché à observer le recrutement de Cdc42 lors de la stimulation. Il a été montré que Cdc42 était recruté à la membrane lors de la stimulation des cellules [Malacombe et al., 2006b], cependant, nous n'avons pas pu reproduire ces résultats en observant le recrutement de Cdc42-GFP à la membrane plasmique ou au site de l'exocytose (voir section 3.2.6 page 180). Il est possible que la cinétique du recrutement de Cdc42 soit très rapide par rapport aux échelles de temps auxquelles nous avons effectué des mesures (de l'ordre de la minute).

De plus, il est probable que les effets de Cdc42 soient dus à la forme active liée au GTP. Il serait donc intéressant d'observer uniquement la forme active de Cdc42. Il existe plusieurs sondes capables de suivre l'activation de Cdc42 :

- une sonde basée sur le FRET qui permet de visualiser la forme active de Cdc42 [Picard et al., 2009, Murakoshi et al., 2011],
- une sonde formée du domaine de WASP (qui se lie uniquement au Cdc42 activé) est liée à un fluorophore et peut-être micro-injecté dans les cellules [Nalbant et al., 2004, Goguen et al., 2011],
- une sonde formée par la fusion de la protéine d'interaction de Rab/Cdc42 (CRIB) et de la GFP ; cette construction se lie spécifiquement à Cdc42 activé [Das et al., 2012].

L'avantage des deux premiers types de sondes (basées sur le FRET, et micro-injectées) est que le signal augmente lors de la liaison avec Cdc42 actif, alors que dans le cas de CRIB-GFP, le signal est seulement concentré. Cependant, cette dernière sonde est plus simple à utiliser.

Il serait donc intéressant de reproduire les expériences de recrutement de Cdc42 en utilisant ces sondes afin de tester s'il y a une activation globale ou locale de Cdc42 lors de la stimulation.

3.3.4 Remodelage de l'actine

Cdc42 est impliqué dans la dynamique de l'actine (voir section 3.1.2 page 154). L'effet de Cdc42 sur le pore de fusion pourrait passer par un remodelage de l'actine. Cependant, nous n'avons pas observé de différence majeure de la forme du cortex d'actine observé avec de la rhodamine-phalloïdine entre les cellules contrôle et les cellules traitées avec un duplex siCdc42-A ou -C (données non publiées), à part quelques fibres de stress supplémentaires (observations non publiées de *Claire Desnos*). Dans les conditions stimulées, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet sur le cortex d'actine (voir section 3.2.6 page 180). Cependant, la méthode d'analyse que nous avons utilisé est relativement peu sensible, et seules d'importantes modifications pourraient être détectées. Nous avons également tenté d'observer des modifications locales du cortex d'actine au site d'exocytose, mais nous avons constaté une contre-corrélation entre l'expression de Lifeact-GFP et la réponse des cellules, rendant difficile une telle analyse. Pour plus de détails, voir chapitre 5 page 226.

Il est donc impossible d'exclure un remodelage de l'actine, cependant, si un effet de Cdc42 sur les structures d'actine existe, il doit concerner des structures de faible taille. Ceci suggère que Cdc42 pourrait avoir un effet local au site de l'exocytose. L'implication de la Myosine II dans la dilatation du pore de fusion suggère une intervention du complexe d'acto-myosine, cependant les modifications du cortex d'actine par Cdc42 restent peu clair.

3.3.5 La tension de la membrane régule l'expansion du pore de fusion

Il a été montré dans les modèles de pore de fusion dans les membranes artificielles que la tension linéaire pouvait permettre l'expansion du pore de

fusion [Karatekin et al., 2003]. Lorsque le diamètre du pore de fusion augmente, la surface de la membrane pliée augmente, ce qui constitue une barrière énergétique importante, comme le suggère l'augmentation de la stabilité du pore de fusion avec la taille des vésicules de sécrétion [Zhang and Jackson, 2010].

Nous avons montré ici qu'il existe une corrélation entre le mode de fusion et la tension de la membrane plasmique : lorsqu'on inhibe l'expression de Cdc42 ou qu'on inhibe l'activité de la Myosine II avec la blebbistatine, la tension diminue avec le nombre d'évènements de libération complète et l'augmentation du nombre d'évènements de libération partielle (voir section 3.2.7 page 184 et section 3.2.8 page 187). La baisse de la tension de la membrane plasmique s'accompagne également d'une diminution de la dynamique des évènements de libération totale (voir section 3.2.3 page 166). La restauration de la tension de la membrane plasmique par l'utilisation d'un milieu hypoosmotique permet la restauration du mode de fusion par libération complète, ce qui suggère que la tension de la membrane plasmique est en effet un moteur de l'expansion du pore de fusion.

Il serait intéressant de confirmer ce résultat en modifiant la tension de la membrane plasmique et en observant le mode de fusion. Pour cela, on pourrait utiliser un montage d'aspiration par micro-pipette de cellule couplé à une mesure ampérométrique de l'exocytose. Bien que cette technique soit difficile à mettre en place, elle permettrait d'ajuster et de mesurer la tension de la membrane tout en observant le mode de fusion des granules de sécrétion.

Il pourrait également être intéressant d'explorer l'influence du substrat sur la tension de la membrane plasmique et l'exocytose. On peut imaginer de tester différents substrats : verre, collagène, poly-D-lysine afin de modifier l'adhérence des cellules. Il existe également des méthodes permettant de déposer des protéines d'adhésion sur un substrat suivant un motif choisi ; on peut alors influencer la forme et la taille des cellules [Azioune et al., 2011, Azioune et al., 2010]. Ces modifications de l'adhésion des cellules pourraient avoir une influence sur la tension de la membrane, et peut-être sur l'exocytose.

Les mesures de tension que nous avons effectuées sont la somme de deux

composantes : $\sigma_{eff} = \sigma + W_0$ avec σ la tension de ligne et W_0 l'énergie d'adhésion au cytosquelette. Il serait intéressant de mesurer la contribution de ces paramètres individuellement sur la dilatation du pore de fusion. Pour cela, on pourrait utiliser des sondes fluorescentes de la tension de la membrane [Grashoff et al., 2010, Meng and Sachs, 2011].

Nous avons également mis en évidence une diminution de la tension de la membrane plasmique lors de la stimulation (voir section 3.2.7 page 184). Certaines données suggèrent qu'une tension trop importante diminue l'exocytose : l'augmentation de la tension dans les mastocytes diminue l'exocytose [Solsona et al., 1998] (volume des cellules multiplié par 4), nous avons également constaté que l'exocytose des cellules BON dans un milieu hyperosmotique dans des conditions moins sévères (le volume des cellules était peu affecté) était diminuée. Ceci suggère qu'il existe un optimum de la tension de la membrane plasmique.

3.3.6 Les différents régulateurs du pore de fusion et de la tension de la membrane

D'autres études suggèrent que l'expansion du pore de fusion est un phénomène lié à la tension de la membrane et que Cdc42 n'est qu'un régulateur parmi d'autres. En utilisant une technique d'imagerie à onde évanescente polarisée, on peut différencier la libération partielle de la libération complète. La sur-expression de la dynamine accélère la libération complète. La sur-expression d'un mutant actif de la dynamine augmente le nombre d'évènement de libération complète alors que la sur-expression d'un mutant à l'activité réduite augmente le nombre d'évènement de fusion partielle [Anantharam et al., 2011] dans les cellules chromaffines. La dynamine n'est pas recrutée aux sites d'exocytose. On peut interpréter l'effet de la dynamine de deux façons différentes :

- la dynamine pourrait activer l'endocytose, diminuant la quantité de membrane plasmique disponible, et augmenter la tension de la membrane plasmique, favorisant la libération complète.
- la dynamine interagit avec l'intersectine-1L, une protéine échafaudage

impliquée dans l'endocytose [Malacombe et al., 2006a] qui est également un régulateur de Cdc42 et agit comme un échangeur de guanosine [Malacombe et al., 2006b]. *Kelly et al.* suggèrent que l'activité de l'intersectine-1L est régulée par l'endocytose, puisque la dynamine est en compétition pour la liaison avec un sous-domaine de l'intersectine-1L, avec la protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich, une protéine de nucléation de l'actine qui est un substrat de la forme active de Cdc42.

La Myosine VI ou son partenaire l'optineurine, en plus d'un rôle précoce dans le transport des vésicules, favorisent la fusion complète des vésicules. L'extinction de l'expression d'une de ces deux protéines augmente le nombre de fusions partielles et le nombre de vésicules arrimées à la membrane [Bond et al., 2011] dans les cellules HeLa. Or la Myosine VI est impliquée dans la régulation de la tension de la membrane plasmique [Buss et al., 2004].

De plus, des résultats similaires à ceux que nous avons obtenus sur le rôle de la Myosine II ont été obtenus dans les cellules chromaffines. Il semble que cette activité permettant l'expansion du pore de fusion soit liée à la phosphorylation de la Myosine II [Neco et al., 2008].

En utilisant de la microscopie *in vivo* dans les glandes salivaires de rongeurs, sur des périodes de temps très différentes (30min) *Welgert et al.* ont montré qu'une polymérisation de l'actine autour de vésicules et le recrutement de la Myosine II favorisaient la fusion complète des vésicules exocytées [Masedunskas et al., 2011]. Les auteurs proposent que ce phénomène permette un équilibrage de la tension de la membrane plasmique avec celle de la tension de la membrane de la vésicule pour favoriser la fusion complète [Masedunskas et al., 2012].

Ces différents résultats suggèrent que le complexe acto-myosine est impliqué dans la dilatation du pore de fusion.

3.3.7 Régulation de la membrane : localement ou globalement ?

Certains résultats suggèrent que le destin des vésicules de sécrétion et leur fusion complète ou partielle se jouent localement et individuellement

pour chaque vésicule :

Dans les cellules acineuses pancréatiques, environ un tiers des vésicules est recouvert de filaments d'actine [Valentijn et al., 2000], de même que dans les vésicules des glandes salivaires. La Myosine II est également recruté sur les granules [Masedunskas et al., 2011]. La Myosine VI qui joue un rôle dans le mode de fusion des vésicules est recrutée sur celles-ci [Bond et al., 2011]. De plus, si la tension de la membrane était homogène et globale, il ne pourrait pas y avoir des évènements de libération partielle et complète en même temps, or on en observe.

Cependant, certaines observations ne sont pas compatibles avec une régulation purement locale du mode de fusion. La mesure de la tension de la membrane a été effectuée sur une zone éloignée des sites d'exocytose, et on observe pourtant une différence de tension. Les vésicules dans les cellules BON ne montrent pas de structure d'actine recouvrant les vésicules (observations non publiées en microscopie confocale de *Claire Desnos*, observations personnelles en microscopie à onde évanescente non publiées). La dynamine qui joue un rôle dans le mode de fusion n'est pas recrutée aux sites d'exocytose [Anantharam et al., 2011].

Il est possible que la dilatation du pore de fusion soit dirigée par deux voies : le complexe acto-myosine et la tension de la membrane plasmique comme régulation globale et les protéines impliquées dans le complexe SNARE comme une régulation locale (voir Synaptotagmine section 3.1.3 page 157).

3.3.8 Rôles physiologiques de la régulation de tension de la membrane plasmique au cours de l'exocytose

Le rôle physiologique de la régulation de la tension de la membrane plasmique au cours de l'exocytose n'a pas encore été établi, cependant, il existe plusieurs pistes d'étude.

Intensité de la stimulation

Il a été établi que l'intensité de la stimulation change le mode de fusion principal des granules de sécrétion dans les cellules chromaffines [Elhamdani

et al., 2001]. Il serait intéressant de mesurer la tension de la membrane plasmique des cellules chromaffines dans différentes conditions de stimulation (« reproduction et alimentation » ou « combat ou fuite »), afin de déterminer si la régulation de la tension de la membrane a un rôle physiologique dans la régulation du mode de fusion.

Régulation de la balance entre l'exocytose et l'endocytose compensatoire

L'exocytose est accompagnée d'endocytose compensatoire. Ce phénomène permet de reprendre le surplus de membrane apporté par l'exocytose.

L'exocytose nécessite une tension de membrane suffisamment haute pour permettre la fusion complète et l'ajout de la membrane de la vésicule à la membrane plasmique. L'insertion de membrane supplémentaire dans la membrane plasmique tend à diminuer la tension de la membrane.

Parallèlement, l'endocytose est plus difficile lorsque la membrane est tendue, puisqu'il est nécessaire de déformer la membrane et de fermer la vésicule endocytée [Boulant et al., 2011]. Or la diminution de la réserve de membrane due à l'endocytose a tendance à augmenter la tension de la membrane plasmique. De plus, la dynamine qui est impliquée dans l'endocytose favorise les événements de fusion partielle [Anantharam et al., 2011], suggérant un couplage entre l'endocytose et l'exocytose.

La régulation de la tension de la membrane plasmique peut être un bon moyen de coupler les deux phénomènes et de permettre une régulation :

- Lorsque la membrane est tendue, l'endocytose est défavorisée, et l'exocytose est favorisée.
- L'exocytose diminue la tension de la membrane, favorisant l'endocytose, et défavorisant l'exocytose.
- L'endocytose augmente la tension de la membrane, favorisant l'exocytose, et défavorisant l'endocytose.

On voit que ce phénomène de balance pourrait s'auto-réguler. On peut également penser que la régulation de la membrane plasmique affecte également la balance entre l'exocytose et l'endocytose.

Afin de tester cette hypothèse, on pourrait mesurer la tension de la membrane plasmique de cellules stimulées dont l'exocytose a été bloquée (par sur-expression de toxine botulique par exemple), ou dont l'endocytose a été bloquée par l'utilisation de drogues (concanavaline A ou l'oxyde de phenylarsine).

Une autre méthode serait la mesure de la capacité de cellules stimulées. La pipette de « patch » pourrait permettre de réguler la pression à l'intérieur de la cellule tout en mesurant à la fois l'exocytose et l'endocytose. Ceci permettrait de voir si un tel couplage existe.

3.3.9 Conclusion

Cdc42 et la Myosine II favorisent la dilatation du pore de fusion par la régulation de la tension de la membrane plasmique. Le rôle physiologique de la régulation de la tension dans l'exocytose n'est pas établi, mais il est possible qu'elle soit impliquée dans la régulation du mode de fusion en fonction de l'intensité de la stimulation ou dans la balance entre l'exocytose et l'endocytose.

3.4 Matériel et méthodes

3.4.1 Vecteurs et siARN

Liste des vecteurs généreusement fournis par d'autres laboratoires :

Vecteur	Source
pNPY-EGFP	Dr. W. Almers (Portland, OR, USA)
pRSET-mRFP	Dr. R. Y. Tsien (San Diego, CA, USA)
Cdc42 résistant à siCdc42-A	S. Gasman (Strasbourg, France)
pHluorine super-ecliptic	Dr. Thierry Galli (Paris, France)
Lifeact-GFP	Dr. Matthieu Piel (Paris, France)

Le vecteur NPY-mRFP a été préparé comme décrit dans cette publication [Desnos et al., 2007b].

L'extinction de l'expression de Cdc42 a été effectuée en transfectant deux duplex : siCdc42-A (5'-GGG CAA GAG GAU UAU GAC ATT-3') et siCdc42-

C (5'-GAU AAC UCA CCA CUG UCC ATT-3'). Le duplex contrôle est un duplex inhibant l'expression de la luciférase (5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG ATT-3'). Tous les duplex ont été obtenus chez Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany).

3.4.2 Culture cellulaire

Milieux et culture

NB : tous les produits chimiques dont la provenance n'est pas précisée ont été obtenus chez Sigma Aldrich (Saint Louis, MO USA).

Les cellules BON nous ont été fournies par *Dr. C.M. Townsend* (Galveston, USA). Ces cellules ont été cultivées dans du milieu « Dulbecco's modified Eagle's medium »¹ (DMEM) Ham's F12 avec de la L-glutamine, additionné de 10% de sérum foetal de veau foetal¹ et de pénicilline/streptomycine¹ (100U1/ μ L et 100 μ g/ μ L respectivement), à 37°C dans une atmosphère contrôlée à 5% CO₂.

Le jour de la transfection, nous collectons les cellules BON confluentes. Elles sont rincées dans un tampon PBS (KCl 0,2g/L, KH₂PO₄ 0,2g/L, NaCl 8g/L et Na₂HPO₄ 1,15g/L), puis détachées du flacon par 1mL de trypsine¹ (2 min, trypsine 0,5mg/mL, EDTA 0,2mg/mL, dans du PBS). La réaction enzymatique est inhibée par l'ajout de milieu complet. La concentration des cellules est ensuite déterminée par comptage sur cellule de Mallasez. Les cellules étaient ensuite déposées à la densité désirée ou électroporées.

Électroporation

Les transfections ont été effectuées par électroporation suivant le protocole décrit par *Desnos et al.* [Desnos et al., 2003]. Les cellules sont lavées et resuspendues à raison de 3.10⁶ cellules par goutte de 50 μ L contenant la quantité désirée de vecteur et de duplex (voir concentrations dans le tableau). Huit chocs sont effectués sur chaque goutte (250V/cm, 3ms, 1Hz) avec un électroporateur « PS10 electropulsator » (Jouan, Saint Herblain, France).

1. PAA laboratories, GmBH (Linz, Austria)

Les cellules électroporées sont resuspendues dans du milieu de culture, et déposées sur des lamelles de verre de 12mm de diamètre recouvertes de 20 μ g de collagène de queue de rat type VII pour l'ampérométrie ou sur des boîtes plastiques à fond de verre recouvertes de 5mg/mL de collagène (MatTEK, Ashland, MA ; World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA).

Quantités de vecteurs et de duplex utilisés dans les différentes conditions (quantités par goutte électroporées) :

Expérience	Conditions
Densité des vésicules, immobilisation	NPY-EGFP : 2,5 μ g
Ampérométrie	bVMAT-1 : 4 μ g ; NPY-mRFP : 1 μ g ; siRNA contrôle siCdc42-A ou -C : 5 μ M
Imagerie de la libération partielle	NPY-pHluorine : 2 μ g ; NPY-mRFP : 2 μ g ; siRNA contrôle siCdc42-A ou -C : 5 μ M
Recrutement de Cdc42	Cdc42-GFP : 1 μ g (+ NPY-mRFP : 2 μ g)
Analyse de l'actin	Lifeact-GFP : 2 μ g ; siRNA contrôle siCdc42-A ou -C : 5 μ M
Charge de sérotonine	bVMAT-1 4 μ g ; NPY-pHluorine : 2 μ g ; NPY-mRFP : 2 μ g ; siRNA contrôle siCdc42-A ou -C : 5 μ M

Extinction de l'expression

24 heures après l'électroporation, les cellules ont été transfectées avec les duplex pARNi avec de l'Interferin (Polyplus, Illkirch, France). Suivant le protocole du fabricant, nous avons ajouté à 100 μ L de milieu sans additif 180nM de duplex, puis 2 μ L d'Interferin. Après vive agitation et 10min d'incubation, la solution a été ajoutée aux cellules adhérentes baignant dans 500 μ L de milieu complet récemment changé. La concentration finale du duplex est de 30nM pour un volume final de 600 μ L.

Les observations ont été conduites 72 heures après l'électroporation.

Immuno-transfert

Afin de déterminer l'efficacité de l'extinction de l'expression de Cdc42, nous avons effectué des migrations de protéines sur gel d'acrylamide (immuno-buvardage). Nous avons utilisé les anti-corps suivants :

- anti-Cdc42 de souris monoclonal (610928, BD, Transduction Laboratories, CA, USA)
- anti-Cdc42 de souris monoclonal (sc8401, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)
- anti- β -tubuline (Sigma Aldrich)
- anti-IgG de souris conjugué à la peroxydase de chèvre (Jackson ImmunoResearch, PA, USA).

La quantification des immuno-buvardages a été effectuée après numérisation par le logiciel *ImageJ*. Les quantités de β -tubuline ont permis de normaliser les résultats.

3.4.3 Imagerie à onde évanescente

Acquisition

Des cellules BON ont été filmées sur un montage de microscope à onde évanescente par prisme [Huet et al., 2006] (BX50WI, Olympus), avec un objectif à immersion à eau 60x (Ouverture numérique 0,9, corrigé Plan, Olympus) pour les expériences de densité et d'arrimage, et un objectif à immersion à eau 63x (Ouverture numérique 1, corrigé Plan-Apochromaticité, Zeiss, Jena, Germany). Un laser à argon (177-G02, Spectra Physics, Newport) a été utilisé pour l'excitation des fluorophores, à l'aide de la raie bleue (488nm) pour NPY-EGFP et NPY-pHluorine, et la raie verte (514nm) pour NPY-mRFP. Des vidéos ont été capturées à 10Hz à l'aide d'une caméra CCD (CoolSnap HQ, Photometrics, Roper Scientific). La profondeur d'évanescence a été réglée à 150nm.

L'imagerie à deux couleurs a été effectuée de la même façon en ajoutant un diviseur d'image (DualView, Photometrics, Roper Scientific).

Analyse de la densité de vésicules

La densité d'objets fluorescents a été déterminée à l'aide du logiciel d'analyse Multi dimensional Image Analysis (MIA) [Racine et al., 2006].

Analyse de l'arrimage à la membrane

Les coefficients de diffusion instantanés ont été calculés à l'aide de la méthode décrite dans la section 3.4.3.

Détection d'évènements de libération partielle

Les vidéos des cellules BON du canal rouge et du canal vert ont été alignées en utilisant une image en lumière blanche avec *ImageJ*. Chaque évènement est identifié et classifié manuellement en suivant les critères suivants :

Libération complète	<p>Canal vert : apparition rapide du signal. Disparition rapide (inférieure à 300ms) du signal accompagnée d'un halo de diffusion.</p> <p>Canal rouge : présence d'une vésicule. Disparition rapide du signal accompagnée d'un halo de diffusion.</p>
Libération partielle	<p>Canal vert : apparition rapide du signal. Pas de halo. Disparition lente ou pas de disparition.</p> <p>Canal rouge : présence d'une vésicule. Pas de halo. Disparition lente ou pas de disparition.</p>

Lorsque l'ensemble ces critères ne sont pas réunis du fait de l'absence de colocalisation des deux marqueurs, la présence d'un amas de vésicules rendant difficile l'identification de la vésicule dans le canal rouge, une différence de plan focal due à l'imperfection de la correction apochromatique de l'objectif, une décision est prise principalement basée sur le critère du signal dans le canal vert et de sa dynamique. Ce critère est validé par le fait que les effets

de Cdc42 ont le même impact sur les deux populations d'évènements (ceux réunissant l'ensemble des critères et ceux basés uniquement sur le canal vert). Les résultats présentés ici sont la réunion des deux populations.

Recrutement de Cdc42

Recrutement global — Les cellules transfectées avec Cdc42-GFP ont été électroporées et observées 24h après par imagerie à onde évanescente. Chaque cellule observée a été stimulée par une perfusion locale de ionomycine 5 μ M ou de milieu Locke pour les contrôles, et 3 images ont été capturées avec une exposition de 100ms : une avant la stimulation, une après 1min de stimulation, et une après 2min de stimulation. L'intensité intégrée de ces images ont été exprimées en pourcentage du signal de l'image avant stimulation et moyennée entre les différentes cellules. La moyenne des cellules non stimulées a été soustraite à la moyenne des cellules stimulées.

Recrutement local — Les cellules transfectées avec Cdc42-GFP et NPY-mRFP ont été électroporées et observées 24h après par imagerie à onde évanescente à deux couleurs à l'aide d'un diviseur d'image (DualView). Les cellules ont été stimulées avec une perfusion locale de ionomycine. Des films de 1min ont été enregistrés à une fréquence de 10Hz avec un temps d'exposition de 100ms.

Le film du canal rouge et du canal vert ont été alignés à l'aide d'une image prise en lumière blanche. Les évènements d'exocytose ont été détectés dans le canal rouge (NPY-mRFP) lorsque le signal des granules disparaissent rapidement avec un halo de diffusion et leurs coordonnées (x, y, plan) ont été notées. Ces coordonnées ont été utilisées pour mesurer le signal de Cdc42-GFP dans le canal vert. Quatre zones d'intérêt ont été mesurées : le pixel correspondant aux coordonnées de l'évènement d'exocytose (x, y, plan), et les trois cercles concentriques autour de ce pixel d'intérêt de diamètres de 10 pixels, 30 pixels, et 60 pixels. Le rapport de l'intensité du pixel central et de l'intensité moyenne du cercle de 60 pixels de diamètre, ainsi que le rapport des intensités moyennes des cercles de 10 et 30 pixels de diamètre sont calculés.

3.4.4 Ampérométrie à fibre de carbone

Acquisition

Les électrodes de carbones ont été généreusement fournies par F. Lemaitre (ENS, Paris). Chaque électrode a été attentivement examinée au microscope et la stabilité de la réponse a été testée en utilisant une solution neuve de dopamine (DA) à 50 μ M.

La détection ampérométrique a été réalisée à l'aide d'un potentiostat AMU-130 (Radiometer Analytical, Copenhagen, Denmark) à 750mV par rapport à une électrode de référence au chlorure d'argent (Ag/AgCl). Le signal analogique a été numérisé à 40kHz (Computer Boards, DAS 1000) puis affiché et analysés à l'aide du logiciel Elphy (G. Sadoc, Gif sur Yvette, France). Ces mesures ont été effectuées sur un microscope inversé (Diaphot TMD, Nikon, Tokyo, Japan) à température ambiante (25-27°C).

Les cellules BON ont été chargées avec des mono-amines afin de faciliter la détection des pics. 24h avant les mesures, le milieu des cellules a été supplémenté avec 300 μ M de sérotonine-hydrochloride (Sigma Aldrich) et 100 μ M de pargyline (Sigma Aldrich). Avant utilisation, les cellules ont été lavées par 3 bains successifs de la lamelle dans du milieu de Locke afin d'éviter l'inactivation de l'électrode en fibre de carbone.

Les cellules ont été transférées dans du milieu de Locke (154mM de NaCl, 5,5mM de KCl, 5,6mM de Glucose, 3,5mM de NaHCO₃, 15mM d'HEPES, 2,5mM de CaCl₂, 1,2mM de MgCl₂, pH 7,4 ajusté avec du NaOH) pendant les enregistrements. L'électrode de travail a été doucement mise en contact avec une cellule isolée à l'aide d'un micro-manipulateur (MO-203, Narishige, Tokyo, Japan). L'extrémité de la micropipette (diamètre < 1 μ m) contenant le sécrétagogue (5 μ M de ionomycine dans du milieu de Locke) a été positionnée à environ 20 μ m de la cellule cible à l'aide d'un micro-manipulateur motorisé (5171, Eppendorf, Hamburg, Germany). Le sécrétagogue a été perfusé par pression à l'aide d'un micro-injecteur (5246, Eppendorf). Pour éviter tout biais du à l'encrassement de l'électrode, celle-ci a été polie toutes les 3 cellules.

Pour restaurer la tension de la membrane plasmique, les cellules BON ont été plongées dans un milieu hypo-osmotique (milieu de Locke modifié avec

98mM de NaCl au lieu de 154mM. L'osmolarité mesurée était de 250 mosm). Les enregistrements débutaient 5 minutes après le changement de milieu pour laisser le temps aux cellules de se stabiliser.

Analyse

Les traces ampérométriques ont été analysées avec des routines écrites dans Elphy au laboratoire. Le seuil de détection pour l'analyse des fréquences a été fixé à 1, 8, 3, 0 ou 10, 0 pA. Pour l'analyse de pics individuels, nous avons sélectionné les pics tels que : $I_{max} > 1,8\text{pA}$ et $Q > 200\text{fC}$. Le pied était pris en compte si la charge était supérieure à 10fC. La pente maximale du pic a été définie comme la pente maximale lors de la phase ascendante, mesurée sur la base de 1,5ms. L'ajustement des courbes a été réalisé avec SigmaPlot (Systat Software). La différence significative des résultats a été testée à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis, suivi d'un post-test de Dunn, ou avec un modèle linéaire écrit dans R par *P. Gestraud (Institut Curie, Paris)* : $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ et $***p < 0.001$.

3.4.5 Mesure de tension de la membrane plasmique

Le pièce optique utilisée dans nos expériences était un laser monomode à Ytterbium fibré ($\lambda = 1064\text{nm}$, TEM 00, IGP Photonics) élargi 2x pour remplir l'ouverture focale arrière de l'objectif (U Plan Apo 100x, N.A. 1.35, Olympus). Le microscope utilisé était un microscope inversé Olympus IX71. L'échantillon était éclairé par de la lumière en transmission, et les films étaient enregistrés à 10Hz à l'aide d'une caméra CCD (Coolsnap HQ, Photometrics, pixel $6.45\mu\text{m}$) contrôlée par Metamorph (Molecular Devices). Les échantillons ont été déplacés à l'aide d'une platine Marzhauser. Les mouvements précis de translation nécessaires au tirage de tubes de membrane étaient réalisés à l'aide d'un module piezzo-électrique (PI - P753) contrôlé par un servo-contrôleur (PI - E665) et un générateur de fonction (Sony Tektronix AFG320).

La calibration a été effectuée en utilisant une modulation d'oscillations contrôlées par le générateur de fonction, inspirée par la méthode décrite par

[Tolic-Norrelykke et al., 2006]. La réponse de la bille à l'oscillation de la platine à une fréquence ω a été enregistrée. Le rapport entre l'oscillation de la platine et l'oscillation de la bille est proportionnel à $\sqrt{1 + (\omega/\omega_c)^2}$, duquel on peut extraire la fréquence de coin, $\omega_c = k/\gamma$, et donc, connaissant le coefficient de viscosité d'une sphère, γ , la rigidité de la pince optique, k . Cette méthode de calibration nous a permis d'éviter des mesures de spectre et de la force de traînée visqueuse sur de longues distances qui requièrent une platine disposant d'un contrôle précis de la vitesse de déplacement. Nous avons validé cette méthode de calibration par l'utilisation de basses puissances du laser, et nous avons mesuré la diffusion Brownienne et utilisé le théorème d'équipartition. Nous avons obtenu $k = 0,039 \times P$ (pN W/nm), avec P la puissance du laser. Cette relation est linéaire dans une gamme de puissance du laser de 0,6W à 1W ($r^2 = 0,99$). Dans cette gamme de puissance, la rigidité de la pince optique était comprise entre 0,023pN/nm et 0,039pN/nm.

Le suivi de la bille était assuré par un programme maison développé sous Matlab (Mathworks) par G. Toombes (Institut Curie, UMR168, Paris) et P. Pierobon. À chaque image, l'algorithme détecte l'anneau sombre de diffraction de la bille en utilisant un seuillage automatique (déterminé comme un écart-type au dessus du minimum de l'image). La précision de la position de la bille dépendait principalement du contraste de l'image, mais nous estimons la précision à 40nm (mesuré sur une bille attachée à la surface).

Les cellules BON ont été stimulées par une perfusion locale de 5s de milieu de Locke additionné de 5 μ M de ionomycine et de 2,5mM de CaCl₂ à l'aide d'un micro-injecteur Eppendorf. La pince optique a été utilisée pour piéger des billes de latex de 3 μ m (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Germany) recouvertes de concanavaline-A et amenées au contact de la membrane de la cellule pendant 4s. La bille a été ensuite tirée à une vitesse de 1 μ m/s par translation de la platine piezoélectrique, permettant la formation de tubes de membrane [Sinha et al., 2011, Nambiar et al., 2009]. La fonction utilisée pour déplacer la platine était une sinusoïde de période de 20s et une amplitude de 10 μ m. Ceci permet la nucléation du tube à une vitesse constante de 1 μ m/s sur plus de 5 μ m. Après au moins 5 secondes de formation du tube (longueur du tube d'environ 5 μ m), la bille était libérée en coupant le

laser. Le tube étant difficilement visible dans les images en transmission, la rétraction de la bille lors de sa libération due à la traction du tube indiquait la formation du tube. Seuls les films montrant cette rétraction ont été analysés. Typiquement, la formation du tube est indiquée par un pic suivi d'un plateau dans le déplacement de la bille par rapport au centre du piège optique (voir FIGURE 3.2.7 page 186).

Bien que nos mesures soient dynamiques, et donnent des réponses comprenant la relaxation visco-élastique et la force de rappel du tube, nous n'avons pas observé de relaxation sur des tubes entre 1 et 5 μm dans les expériences contrôle où la traction était stoppée. De plus, le plateau après le pic (voir FIGURE 3.2.7 page 186) est plat sur une longueur de plusieurs microns, indiquant que les mesures sont quasi-statiques et qu'on peut faire la moyenne des différentes courbes. Le déplacement de la bille par rapport au centre optique (et donc la force nécessaire pour tirer le tube) a été mesuré à des longueurs de tube entre 2 et 3 μm (*i.e.* entre 20 et 30 images après le pic).

3.4.6 Test de la charge des vésicules

Les cellules BON ont été transfectées suivant le protocole décrit 3.4.2, puis déposées dans des boîtes de 24 puits à une densité de 250 000 cellules/puits. La charge de sérotonine a été effectuée 3 jours plus tard. Les cellules ont été incubées pendant 2h dans du milieu de culture complet supplémenté de 10nM de [^3H]sérotonine (Amersham) avec ou sans 1 μM de réserpine, un inhibiteur de VMAT. Une chasse a ensuite été effectuée pendant 1h avec du milieu complet dépourvu de sérotonine. Les cellules ont été lavées 3 fois avec du milieu de Locke supplémenté avec 0,2% d'albumine de sérum de boeuf, puis lysées dans 250 μL de Triton-X100 à 0,2%. Une fraction de chaque échantillon a été utilisée pour mesurer la radioactivité, et une autre partie pour mesurer la concentration de protéines à l'aide d'un test de Bradford. Les résultats de charge ont été normalisés par la quantité de protéines.

Preuve de principe

Couplage de l'imagerie à onde évanescente et de l'ampérométrie

4.1 Introduction

Ce chapitre expose la mise au point du couplage entre l'imagerie à onde évanescente et la mesure ampérométrique de l'exocytose. Ce travail est le fruit d'une collaboration avec l'équipe de *Frédéric Lemaître* du laboratoire de *Christian Amatore*, à l'ENS, Paris, France. *Anne Meunier* et *Rémy Fulcrand* ont réalisé les mesures ampérométriques et de la micro-gravure du montage. Je me suis occupé avec la participation de *Marine Bretou* et d'*Isabelle Fanget* de l'imagerie à onde évanescente.

L'objectif était de faire une preuve de principe, montrant qu'il était possible de coupler les deux techniques. Ce couplage repose sur l'utilisation d'oxyde d'indium-étain (ITO). Ce matériau est à la fois transparent et conducteur. Il peut être utilisé comme substrat pour les cellules et permettre l'observation par onde évanescente des cellules. L'ITO peut également être utilisé comme une électrode pour détecter la libération de mono-amines (voir [FIGURE 4.1](#) page suivante). Ce couplage permet l'observation de la même face de la cellule, et donc la détection des événements de fusion par l'imagerie et l'ampérométrie, et l'étude de l'exocytose avec la résolution temporelle de l'ampérométrie et la résolution spatiale de l'imagerie à onde évanescente.

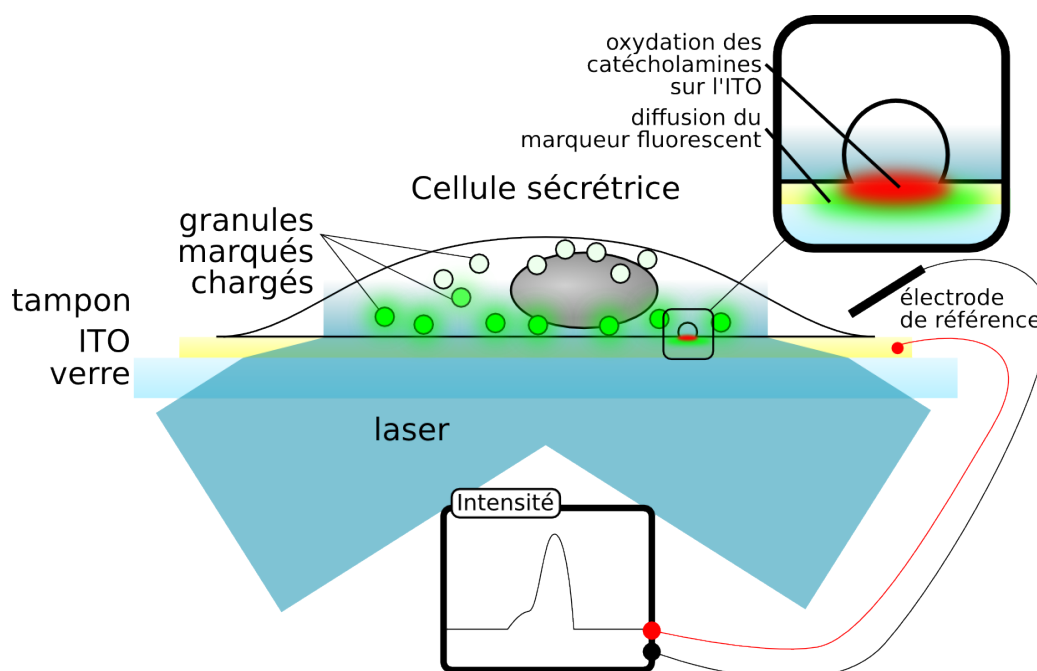


FIGURE 4.1 – Le substrat utilisé pour les cellules est de l'ITO, un matériau transparent et conducteur qui permet l'imagerie à onde évanescente et la détection de la libération des catécholamines oxydables par ampérométrie. Cette technique permet d'étudier la même face de la cellule par l'imagerie et l'ampérométrie, et la détection synchrone d'évènements de fusion, et leur analyse spatio-temporelle.

4.1.1 État des lieux des techniques d'investigation de l'exocytose et du pore de fusion

Il existe plusieurs techniques qui permettent d'étudier l'exocytose et en particulier le pore de fusion. Ces techniques sont soit basées sur l'optique, soit sur des mesures électriques (voir section 1.9 page 70 et la revue [Omiatek et al., 2010]).

Méthodes optiques

En bref, les différentes méthodes optiques permettant l'analyse de l'exocytose et du pore de fusion sont :

- La microscopie électronique (voir section 1.9.3 page 84).
- L'imagerie par onde évanescente qui permet le suivi des granules de sécrétion marqués, et la détection d'évènements de fusion menant à la libération du contenu des vésicules (voir section 1.9.3 page 76). Des stratégies utilisant le pH acide des vésicules de sécrétion et les propriétés de la pHfluorine ou des boîtes quantiques (Quantum dots) permettent de détecter les évènements de libération partielle (voir section 3.2.4 page 170).
- L'imagerie par onde évanescente polarisée qui permet de voir les déformations de la membrane et différencier les évènements de fusion complète et de « Kiss & Run » [Anantharam et al., 2010].
- La microscopie super-résolutive (voir section 1.9.3 page 81).

Ces méthodes permettent une forte résolution spatiale ($\leq 200\text{nm}$), mais une faible résolution temporelle ($\sim 100\text{ms}$), voir l'impossibilité de faire une étude dynamique (microscopie électronique et super-résolutive).

Méthodes électriques

Les méthodes électriques permettant l'analyse de l'exocytose et du pore de fusion sont :

- la mesure de la capacité de la membrane plasmique,
- la mesure ampérométrique de la libération du contenu vésiculaire.

Ces méthodes ont une forte résolution temporelle (10^{-5}s) mais ne permettent pas d'observer les évènements précédant l'exocytose, et ne donnent pas d'indication sur la localisation des évènements.

4.1.2 Questions biologiques élucidables grâce au couplage de la microscopie à onde évanescente et de l'ampérométrie

Le couplage de l'ampérométrie et de l'imagerie à onde évanescente pourrait permettre de suivre avec précision les vésicules de sécrétion dans les dernières étapes avant l'exocytose (capture dans le cortex d'actine, arrimage

à la membrane plasmique), et d'observer en détail la dilatation du pore de fusion.

Le couplage de mesure de capacité et l'imagerie à onde évanescente a été mis au point par *Rettig et al.* [Becherer et al., 2007]. Cette technique permet d'étudier l'ouverture du pore de fusion et les événements précédents la fusion. Cependant, elle nécessite le patch des cellules, ce qui complique la technique, et renseigne sur la dynamique de la membrane pendant l'exocytose, mais pas sur la dynamique du contenu.

Cette technique permettrait de répondre à certaines questions biologiques non résolues :

- Existe-t-il des zones privilégiées pour la fusion des vésicules de sécrétion, et le mode de fusion dans ces zones est-il différent de celui du reste de la cellule ?
- Y a-t-il une sélection par la taille des molécules exocytées ? L'utilisation de catécholamines pour assurer la détection ampérométrique et d'une protéine volumineuse (NPY, chromogranine) pourrait permettre de mettre en évidence l'exocytose différenciée basée sur la taille des molécules, et comparer les cinétiques de libération.
- Combien de fusion partielle peuvent effectuer les granules avant d'être recyclés ? L'analyse des mouvements des vésicules avant et après la fusion pourrait permettre de mettre en évidence le nombre de « Kiss & Run » que peut effectuer un granule avant d'être recyclé.
- Les événements de fusion transitoire détectés par ampérométrie sont-ils réellement des événements de libération partielle (voir section 3.2.4 page 170) ?

4.1.3 Cahier des charges

Les techniques d'ampérométrie et d'imagerie à onde évanescente nécessitent certaines conditions expérimentales pour fonctionner.

Imagerie à onde évanescente

L'imagerie à onde évanescente nécessite d'avoir un substrat pour les cellules transparent permettant le passage du laser. Le substrat doit également avoir un indice optique supérieur à celui du milieu de culture pour générer une onde évanescente. Enfin, le revêtement du verre ne doit pas diffuser la lumière.

Les cellules sont généralement déposées sur le substrat à une densité relativement élevée pour permettre l'étude de plusieurs cellules à la suite.

Ampérométrie

Pour que la détection d'un signal ampérométrique se dégage du bruit, il est important de réduire le courant faradique en réduisant la surface d'ITO exposée au milieu conducteur. La bonne détection dépend aussi de la conductance de l'électrode d'ITO. La conductance augmente avec l'épaisseur de l'ITO.

Utiliser le substrat comme électrode impose d'avoir une densité de cellule faible puisqu'il est préférable d'avoir une seule cellule sur l'électrode afin d'éviter la détection d'évènements provenant d'autres cellules que celle observée. Cette contrainte est liée au mode de perfusion par perfusion locale.

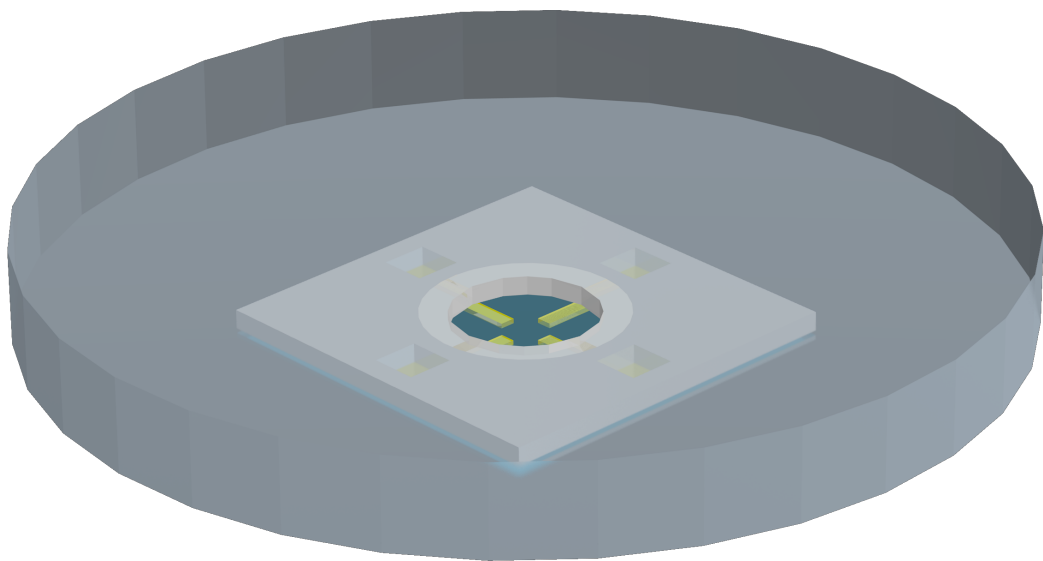
4.2 Choix techniques et enjeux

Le cahier des charges fait apparaître des contraintes contradictoires pour les techniques, il faut donc trouver des compromis permettant le couplage des deux techniques.

4.2.1 Ingénierie de la chambre

Les chambres permettant le couplage de l'imagerie à onde évanescente et l'ampérométrie ont été réalisées par techniques de micro-gravures. Plusieurs modèles ont été mis au point que nous discuterons ici, mais ils reposent sur le même principe (voir [FIGURE 4.2.1](#) page suivante).

L'épaisseur de l'électrode d'ITO a été fixée après différents essais à 150nm, ce qui offre un bon compromis entre la conductance et les propriétés optiques. Des lamelles de verre recouvertes d'ITO ont été micro-gravées pour former 4 électrodes de 200 μ m de longueur. La longueur de l'électrode est comprise entre 2mm et 750 μ m suivant les montages. La base de l'électrode est constituée d'un carré d'ITO qui permet la soudure des contacts pour la détection du courant. Une résine bio-compatible isolante de 20 μ m est ensuite déposée sur la lamelle de verre et les électrodes afin de délimiter la surface exposée au milieu et réduire le bruit. Les contacts sont ensuite soudés sur les zones prévues à cet effet. L'ensemble est ensuite fixé sur le fond d'une boîte plastique. Voir section 4.5.3 page 222 pour plus de détails sur la fabrication de la chambre.



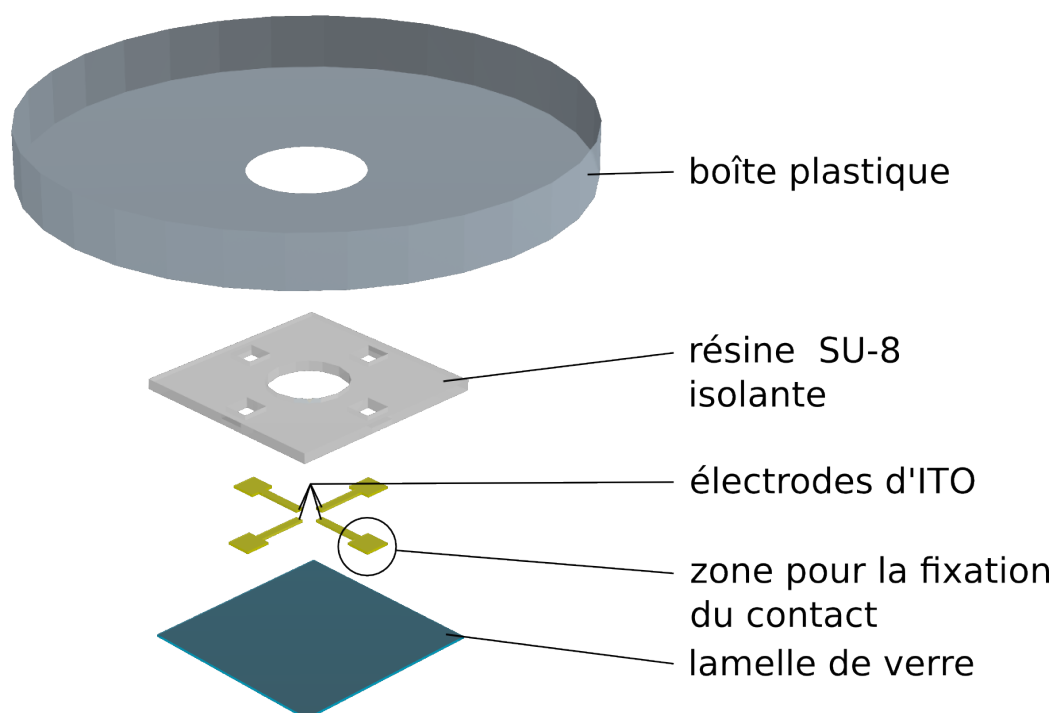


FIGURE 4.2 – Le montage est constitué d'une lamelle de verre, qui sert de support, de 4 électrodes d'ITO de $200\mu\text{m}$ de large, d'une résine isolante SU-8 3010, qui permet de limiter la partie exposée de l'électrode, et d'une boîte en plastique pour contenir le milieu de culture.

Une des difficultés principales que nous avons rencontrée était de réussir à avoir une cellule située sur l'électrode. Les cellules sont disposées aléatoirement sur le montage. Une fois les cellules adhérentes, le milieu de culture est changé pour charger les cellules en sérotonine ; lavées ; et finalement, le milieu est changé pour du milieu de Locke. Ces changements de milieux provoquent le décollement des cellules. Afin d'améliorer l'adhérence des cellules, nous avons recouvert de collagène les montages. Nous avons observé que qu'une faible concentration de collagène n'altérerait pas la qualité de la détection des évènements.

Nous avons également essayé plusieurs formes de la résine SU-8. Il apparaît que les montages qui permettent le dépôt le plus efficace des cellules sont ceux où la résine SU-8 recouvre la totalité de la surface de verre et ne présente des ouvertures qu'au niveau des électrodes. Ceci peut-être dû au fait que les

cellules adhèrent moins bien sur l'ITO que sur le verre, ou que la différence de hauteur de l'ITO et du verre, bien que faible (150nm), défavorise le dépôt des cellules sur les électrodes.

Deux montages efficaces pour le dépôt des cellules sont représentés ci-dessous.

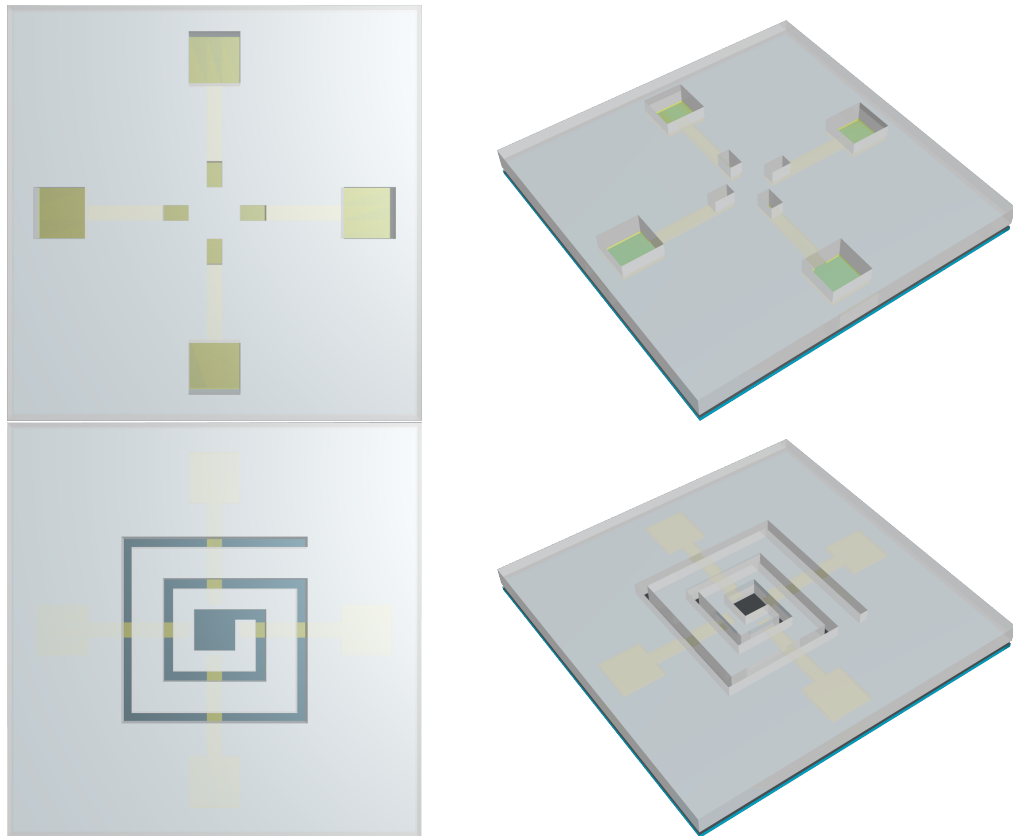


FIGURE 4.3 – Ces deux motifs de résine présentent soit des puits (**haut**), soit une spirale (**bas**). Ceci permet de limiter la surface de verre exposée et de concentrer les cellules sur les électrodes. Les résultats exposés ici sont issus du montage en spirale. *N.B.* : les ouvertures prévues pour le raccordement des électrodes à l'appareil de mesure sont recouvertes par la boîte plastique. Seul le centre de la résine est exposé aux cellules.

4.2.2 Préparation des cellules

Pour optimiser la probabilité d'obtenir une cellule marquée et chargée en sérotonine sur les électrodes, nous avons choisi d'utiliser la lignée cellulaire dérivée des cellules BON BC21. Cette lignée stable exprime NPY-GFP. Toutes les cellules sont donc marquées. Afin d'améliorer la charge en sérotonine des cellules, nous avons procédé à l'électroporation des cellules BC21 en présence de sérotonine en plus de la charge dans le milieu de culture.

4.3 Résultats

Nous avons donc collecté des cellules BC21 et nous les avons électroporées en présence de sérotonine, puis nous les avons déposées dans les montages décrits ci-dessus, et incubées 24h dans du milieu de culture supplémenté en sérotonine. Les cellules ont ensuite été transférées dans du milieu de Locke, et observées par imagerie à onde évanescente. Une électrode de référence a été introduite dans le milieu. Lorsqu'une cellule est présente sur l'électrode, cet électrode est alors raccordée à l'appareil de mesure. La cellule est stimulée par une perfusion locale de ionomycine, et les enregistrements vidéo et ampérométrique sont déclenchés.

Grâce à cette technique, nous sommes parvenus à détecter des événements de fusion à la fois par imagerie à onde évanescente et ampérométrie.

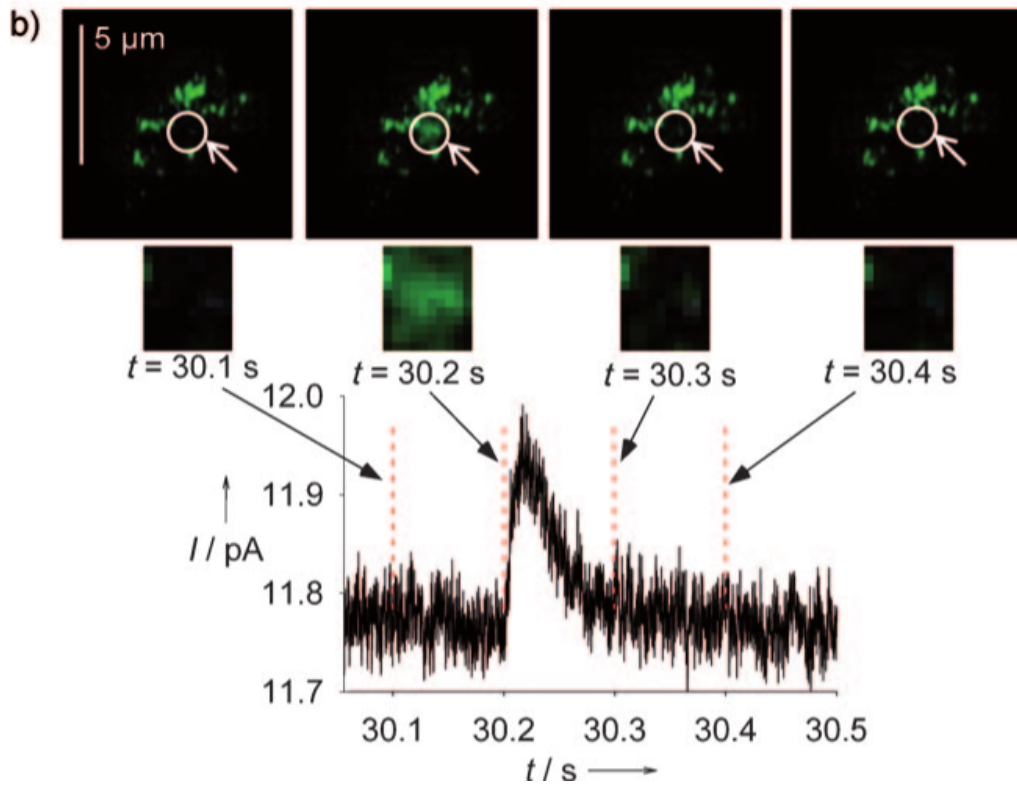
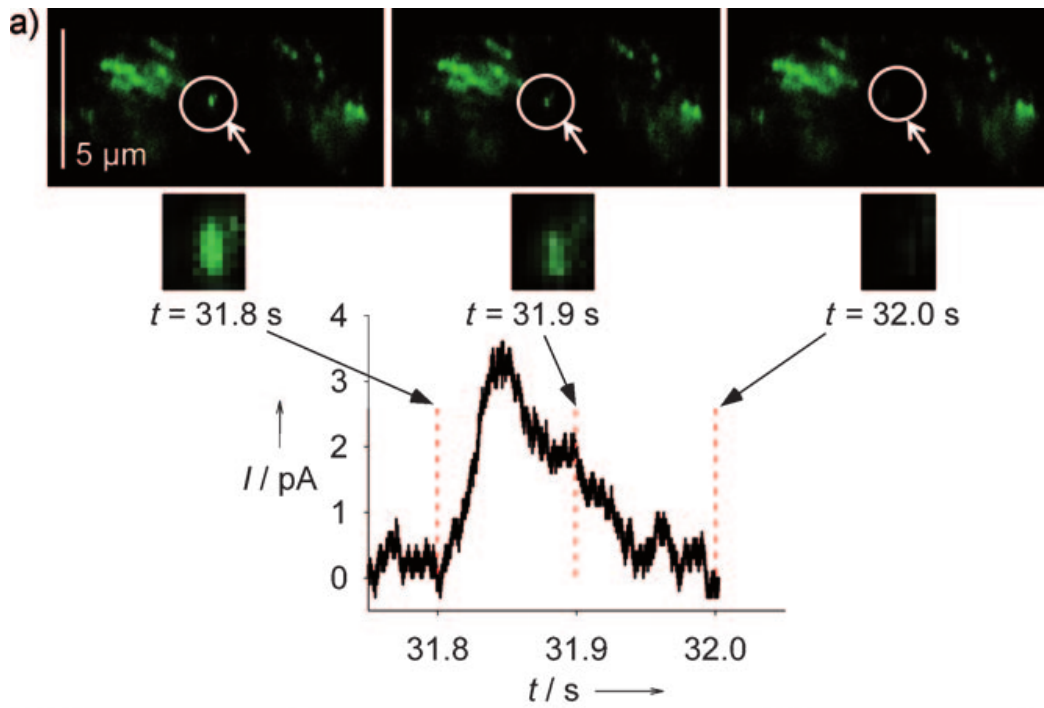


FIGURE 4.4 – **a,b**) Deux exemples représentatifs d'évènements de fusion (haut : imagerie à onde évanescente, bas : ampérométrie). L'origine du temps correspond au début de la stimulation. Pour l'imagerie à onde évanescente, la cellule entière est montrée ici, et chaque point correspond à une vésicule. L'évènement de fusion est montré en encart (zoom 500%). Les évènements de fusion sont caractérisés par la disparition rapide d'une vésicule(**a**), ou par la présence d'un halo de diffusion (**b**). La mesure ampérométrique correspondante est montrée par le pic.

Ces résultats montrent qu'il est possible de coupler les deux techniques, cependant, le couplage ne peut pas encore être exploitée en routine.

4.4 Discussion et perspectives

4.4.1 Limites actuelles de la technique

La principale limite de la technique actuellement est le faible nombre de cellule analysable. De nombreux montages ne présentent aucune cellule analysable. De plus, toutes les cellules ne répondent pas au stimulus, ou ne sont pas suffisamment chargées en sérotonine pour être détectés en ampérométrie. Il faut donc préparer et observer un très grand nombre de montages pour avoir un résultat.

Une autre limite vient de la synchronisation des enregistrements d'imagerie et d'ampérométrie. Il n'existe pas encore de logiciel permettant le déclenchement des enregistrements simultanément.

Les enregistrements par l'ITO restent peu intenses, ce qui peut limiter la détection des évènements. En effet, la sensibilité des dispositifs est sans doute plus faible que celle des électrodes à fibre de carbone.

4.4.2 Augmenter la probabilité d'avoir une cellule observable

Afin d'augmenter la probabilité d'avoir une cellule observable, il pourrait être intéressant de mettre en place des techniques de micro-fluidique afin de

déposer les cellules spécifiquement sur les électrodes. Le placement d'un drain à proximité des électrodes permettrait de créer une aspiration au moment du dépôt des cellules et de les concentrer à proximité des électrodes. Cette technique pourrait également permettre de réduire la taille des électrodes, et la multiplication de leur nombre ce qui permettrait l'amélioration du bruit et du nombre de cellules observables par boîte.

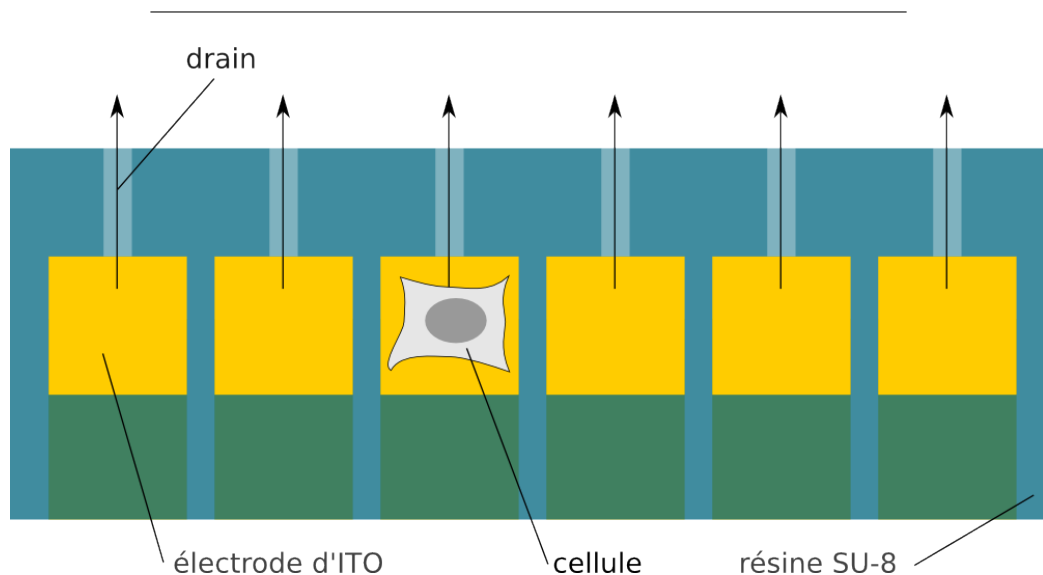


FIGURE 4.5 – Les drains placés à proximité des électrodes isolées par la résine SU-8 seraient reliés à une seringue permettant de créer une aspiration au moment du dépôt des cellules sur le montage. Ceci permettrait de déposer les cellules sélectivement sur les électrodes.

Un facteur limitant semble être la concentration des mono-amines dans les vésicules de sécrétion. La mise au point des techniques de charge et la sélection d'un modèle cellulaire adapté paraît indispensable à l'utilisation de la technique en routine. L'utilisation de cellules chromaffines de souris exprimant NPY-GFP semble être un bon choix. En effet, les cellules chromaffines ont de grandes vésicules très concentrées en catécholamines permettant la détection de pics ampérométriques de forte amplitude.

4.4.3 Synchroniser les acquisitions

La synchronisation des acquisitions est nécessaire à la bonne utilisation de la technique. Cela nécessitera le développement de routines à l'aide de logiciels d'acquisition comme LabView.

Cependant, il est également possible de mettre au point d'autres méthodes. Il est possible de se référer à un évènement isolé pour effectuer la synchronisation, mais cela peut se montrer difficile si le nombre d'évènements est important.

Il est envisageable d'amener brièvement au contact de l'électrode à la fin de l'acquisition un fil conducteur qui générera un courant. On peut alors synchroniser le contact du fil et de la surface sur les images et le courant généré.

Dans le cas d'un modèle de montage avec drains, on peut tirer avantage de la micro-fluidique et perfuser brièvement un mélange de molécules fluorescente et oxydable. Ceci permettra également de synchroniser les acquisitions.

On peut également envisager de photo-lyser une molécule oxydable cagée.

4.5 Matériel et méthodes

4.5.1 Culture cellulaire

Les cellules BON nous ont été fournies par *Dr. C.M. Townsend* (Galveston, USA). La lignée cellulaire BC21 a été développée par *Dr. Isabelle Fanget* dans notre laboratoire. Ces cellules ont été cultivées dans du milieu « Dulbecco's modified Eagle's medium » (DMEM) Ham's F12 avec de la L-glutamine, additionné de 10% de sérum foetal de veau foetal et de pénicilline/streptomycine (100U1/ μ L et 100 μ g/ μ L respectivement), à 37°C dans une atmosphère contrôlée à 5% CO₂.

Le jour de l'électroporation, nous collectons les cellules BON confluentes. Elles sont rincées dans un tampon PBS (KCl 0,2g/L, KH₂PO₄ 0,2g/L, NaCl 8g/L et Na₂HPO₄ 1,15g/L), puis détachées du flacon par 1mL de trypsine (2 min, trypsine 0,5mg/mL, EDTA 0,2mg/mL, dans du PBS). La réaction enzymatique est inhibée par l'ajout de milieu complet. La concentration des

cellules est ensuite déterminée par comptage sur cellule de Malasez. Les cellules étaient ensuite déposées à la densité désirée ou électroporées.

4.5.2 Électroporation de sérotonine

Les transfections ont été effectuées par électroporation suivant un protocole adapté de celui décrit par *Desnos et al.* [Desnos et al., 2003]. Les cellules sont lavées et resuspendues à raison de $3 \cdot 10^6$ cellules par goutte de 50 μ L contenant 100 μ M de sérotonine. Dix chocs sont effectués sur chaque goutte (250V/cm, 1ms, 1Hz) avec un électroporateur « PS10 electropulsator » (Jouan, Saint Herblain, France).

Les cellules électroporées sont resuspendues dans du milieu de culture supplémenté avec 100 μ M de sérotonine et déposées sur montages recouverts de 0,5mg/cm² de collagène (boîtes plastiques MatTEK, Ashland, MA ; World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA).

L'observation des cellules est effectuée 24h–36h après l'électroporation.

4.5.3 Réalisation de la chambre

Un film fin d'ITO (90% In₂O₃ / 10% SnO₂ ; 150nm d'épaisseur ; ACM, Villiers Saint Frédéric, France) est déposé sur des lamelles de verre (22mm \times 22mm \times 0,13mm) pour atteindre une résistance électrique suffisamment basse ($\leq 20\Omega/\text{m}^2$) et un indice de réfraction bas (1,52).

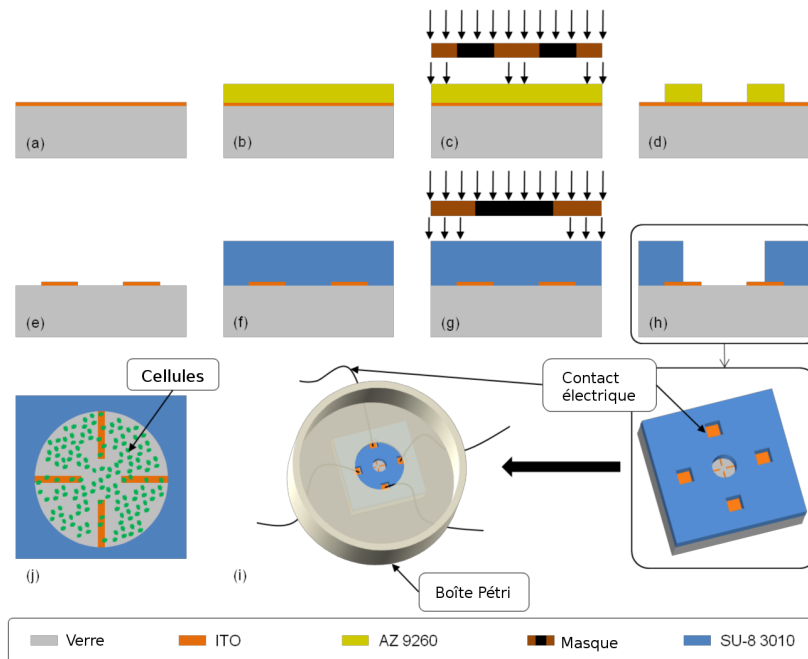


FIGURE 4.6 – (Voir le texte)

Voir FIGURE 4.5.3. **a)** Les électrodes d'ITO ont été réalisées à par photolithographie. Une résine photorésistante (AZ 9260, Clariant GmbH, Allemagne) a été déposée sur l'ITO par tournette. **b)** Le montage a été pré-cuit sur plaque chauffante (110°C), puis exposé aux UVs à l'aide d'un masque (**c**) et développé (AZ 400K + H_2O) (**d**). L'ITO dépourvu de résine photorésistante a été éliminé par traitement à l'acide chloridrique, puis la résine a été retirée avec de l'acétone (**e**). Ces étapes mènent à la formation des électrodes d'ITO de $200\mu\text{m}$ de large. Pour isoler les électrodes et réaliser des espaces de travail, les électrodes d'ITO de $750\mu\text{m}$ de long ont été recouvertes d'une couche de résine SU-8 3010 (MicroChem [®]) de $10\mu\text{m}$ par tournette (**f**), chauffée légèrement sur plaque chauffante (65°C), exposée aux UVs au travers d'un masque différent (**g**), cuite sur plaque chauffante (95°C) et développée dans un bain d'acetate de propylène-glycol-méthyl-éther (PGMEA) (**h**). Enfin, pour améliorer l'adhésion des cellules à la surface du montage, un plasma d'oxygène a été effectué pendant 1min. Puis, le montage est fixé à une boîte de plastique (**i**) avec de la colle silicone (3140 RTV coating, Dow Corning [®]), compatible

avec la microscopie à onde évanescente et préalablement percée (la lamelle de verre présente à l'origine a été retirée). La surface de verre du fond a été recouverte de 250 μ L d'éthanol 30% contenant 5 μ g/mL de collagène. Après 3h d'évaporation, les montages ont été rincés avec du PBS et conservés à 4°C.

4.5.4 Imagerie à onde évanescente

Le montage utilisé est celui décrit par [Huet et al., 2006]. Un montage à onde évanescente a été installé sur un microscope droit (BX50WI; Olympus, Tokyo, Japan), par un prisme hémisphérique. L'onde évanescente est générée à partir de la raie à 488nm d'un laser à argon (177-G02; Spectra Physics, Newport, Irvine, CA) entrant radialement le prisme de BK7 par son côté sphérique, et se réfléchissant à l'interface verre ou ITO / milieu couplé au prisme par de l'huile à immersion (518 C; Carl Zeiss MicroImaging, Oberkochen, Allemagne). L'angle d'incidence du laser est ajusté de façon à ce que la profondeur d'évanescence soit de 150nm. L'illumination est contrôlée par un obturateur couplé à la caméra. Les cellules sont observées à l'aide d'un objectif à immersion à eau (W "Plan-Apochromat" 63 \times /1,0 ouverture numérique; Zeiss), et un filtre passe-bande 515–550nm ou un filtre passe-haut 515nm (Olympus). Les images ont été enregistrées avec une caméra CCD (CoolSnap HQ; Photometrics, Roper Scientific, Tucson, AZ). Dans ces conditions, les pixels sont de 102,3nm. Les enregistrements ont une durée de 60s, avec un temps d'exposition de 100ms à 10Hz. Les événements d'exocytose ont été détectés manuellement et leur position et leur temps par rapport au début de l'acquisition notés.

4.5.5 Enregistrement ampérométrique

La détection des événements d'exocytose au niveau des électrodes d'ITO a été effectuée à l'aide d'un pico-ampéromètre (model AMU-130, Radiometer Analytical Instruments, Copenhagen, DK) à un potentiel constant de $E=0,65V$ par rapport à l'électrode de chlorure d'argent (Ag/AgCl). L'évolution du courant est mesurée (signal numérisé à 40kHz) et enregistrée sur un

ordinateur (Latitude D 600, Dell) à l'aide d'un convertisseur D/A (Powerlab 4SP, AD Instruments) et son interface logicielle (Chart version 4.2 pour Windows, AD Instruments). La capacité des cellules BON BC21 à produire des événements a été vérifiée par ampérométrie à fibre de carbone. Le signal a été filtré du bruit à 50Hz résiduel par un filtre à cran.

Discussion

Rôle de l'actine et outils d'investigation

Au cours de cette thèse, nous avons étudié différentes étapes de l'exocytose : le recrutement des granules à la membrane plasmique et leur arrimage, ainsi que la dilatation du pore de fusion. Au cours de ces deux processus, nous avons mis en évidence l'intervention du cortex d'actine. Ces études s'ajoutent à de nombreuses autres qui tendent à remettre en question le simple rôle de barrière du cortex d'actine au cours de l'exocytose. Nous reprendrons brièvement les différentes fonctions du cortex d'actine ici. Cependant, de nombreuses études, dont les nôtres, se heurtent aux difficultés d'étudier le cortex d'actine, tant sa structure que sa dynamique. Une partie de cette thèse a été consacrée au développement de nouveaux outils d'investigation (photo-activation, couplage imagerie à onde à évanescente et ampérométrie). Nous discuterons ici les outils et les sondes disponibles pour l'analyse de l'actine.

5.1 Rôles du cortex d'actine dans l'exocytose

Pour plus de détails voir section 3.1.1 page 150.

Un des premiers rôles attribués au cortex d'actine est celui de barrière : *Nakatana et al.* ont montré une corrélation entre les sites d'exocytose et ceux où le cortex d'actine est le moins présent dans les cellules chromaffines. Ils n'ont pas pu mettre en évidence le remodelage du cortex d'actine après stimulation observé par microscopie électronique [Nakata, 1992]. Les cellules ont été stimulées avec de la digitonine pendant 10 minutes. Ces conditions sont éloignées des conditions physiologiques. Des résultats similaires ont été obtenus par *Sontag et al.* [Sontag et al., 1988]. *Vitale et al.* ont montré dans des condi-

tions de stimulation plus proches des conditions physiologiques (perfusion de nicotine ou de solution à haut potassium) que la disruption du cortex d'actine provoque l'augmentation du nombre de vésicules rapidement libérables, ainsi que le nombre de granules proches de la membrane plasmique observés en microscopie électronique dans les cellules chromaffines [Vitale et al., 1995].

Cependant, le cortex d'actine présente des lacunes [Nakata, 1992] et la dépolymérisation complète du cortex d'actine réduit l'exocytose [Orci et al., 1972] dans les cellules beta du pancréas, ce qui suggère un rôle plus complexe que celui de simple barrière.

Au cours de cette thèse, nous avons montré que le cortex d'actine pourrait être impliqué dans d'autres phénomènes.

(i) Nous avons montré que le cortex d'actine était impliqué dans la rétention des granules à la membrane plasmique via l'interaction de Myrip et de la Myosine Va.

Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par d'autres groupes montrant que la mobilité des granules est réduite dans le cortex d'actine [Oheim et al., 1999, Johns et al., 2001, Desnos et al., 2003] dans les cellules chromaffines. Ce processus pourrait se faire via la capture des granules dans des structures polygonales du cortex [Giner et al., 2007, Riedl et al., 2008]. Il n'a pas encore été déterminé à quel point la dynamique de l'actine est impliquée dans la mobilité des granules et leur adressage aux sites d'arrimage à la membrane plasmique.

(ii) Le complexe d'acto-myosine pourrait être impliqué dans la régulation de la tension de la membrane plasmique, comme cela a été montré dans les cellules immunitaires [Parsons et al., 2010]. L'inhibition de la Myosine II diminue la tension de la membrane plasmique, ainsi que l'inhibition de l'expression de Cdc42 qui est impliquée dans la dynamique de l'actine (voir section 3.1.2 page 154). Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'importantes restructurations du cortex d'actine lors de la stimulation, ni de différences de structures de l'actine entre le contrôle et les cellules dont l'expression de Cdc42 a été inhibée.

La difficulté de l'analyse du cortex d'actine vient du manque d'outils pour analyser l'actine, sa structure et sa dynamique.

5.2 Les sondes de l'actine

Il existe de nombreuses sondes de l'actine :

- La phalloïdine est une toxine qui s'associe aux fragments d'actine. La phalloïdine marquée par la rhodamine permet le marquage du cortex d'actine, cependant, la phalloïdine empêche la dépolymérisation de l'actine. Cette sonde est donc adaptée aux études statiques, mais pas aux études dynamiques.
- L'actine-GFP est une fusion entre l'actine et la GFP. La sur-expression de l'actine-GFP permet le marquage des filaments d'actine, cependant, une importante partie du signal est soluble et donne un mauvais rapport signal sur bruit. De plus, on peut se demander si la fixation de la GFP (27kDa) sur l'actine (42kDa) ne perturbe pas la polymérisation de l'actine.
- La Moesine-GFP est une protéine impliquée dans l'adhésion de l'actine à la membrane plasmique [[Amieva and Furthmayr, 1995](#)].
- L'Utrophine possède un domaine d'interaction avec l'actine qui peut être lié à la GFP et marquer ainsi le cortex d'actine.
- Les domaines d'interaction avec l'actine de différentes protéines se liant à l'actine (ABP) peuvent être fusionnés à la GFP pour marquer l'actine.
- Lifeact est issu du domaine d'interaction avec les filaments d'actine d'une protéine d'interaction avec l'actine de la levure. Un petit peptide de 17 acides aminés a été isolé, et peut être fusionné avec la GFP afin de marquer le cortex d'actine [[Riedl et al., 2008](#)].

Nous avons testé ces différents marqueurs dans les cellules BON.

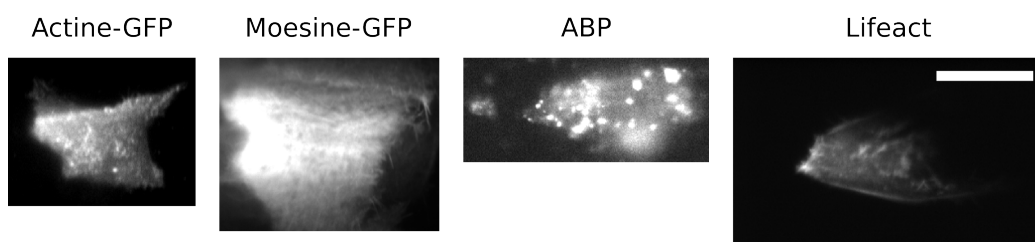


FIGURE 5.1 – Des cellules BON ont été transfectées avec 2 μ g de plasmide codant pour un marqueur de l'actine (indiqué au dessus de l'image correspondante). Les cellules ont été observées par imagerie à onde évanescente avec un temps d'exposition de 100ms. L'échelle est la même pour toutes les images (10 μ m).

L'utrophine et l'ABP ne nous ont pas permis d'identifier de structures filamenteuses d'actines dans les cellules BON. L'actine-GFP et Lifeact nous ont permis d'observer des structures filamenteuses d'actine. Cependant l'actine montre un fort rapport signal sur bruit, et bien que *Riedl et al.* affirment que Lifeact ne modifie pas la dynamique de l'actine, nous avons observé une inhibition de l'exocytose lors de la sur-expression de Lifeact.

Il est probable que la quantité de la sonde soit un facteur important et qu'une quantité trop importante perturbe la dynamique de l'actine. Il est alors important de trouver un bon compromis entre une quantité trop faible rendant le signal de la sonde indétectable et une quantité trop importante qui perturberait la dynamique de l'actine. Pour contrôler la quantité de la sonde, on peut envisager de micro-injecter dans les cellules de l'actine-GFP ou Lifeact-GFP.

Il est préférable d'utiliser ces marqueurs fusionnés à la GFP qu'à la mRFP, car la tendance à s'agréger de la mRFP crée des artefacts, et pourrait altérer la dynamique de l'actine.

5.3 Analyse d'image

Une difficulté de l'analyse de l'actine est l'analyse d'image. La structure du cortex d'actine est très variable d'une cellule à l'autre. Il est donc très difficile de mettre en évidence une différence sans méthode d'analyse quantitative.

Nous avons observé le cortex d'actine dans les cellules traitées avec un duplex contrôle, siCdc42-A et siCdc42-C, marquées avec Lifeact-GFP (voir FIGURE 5.3 page suivante).

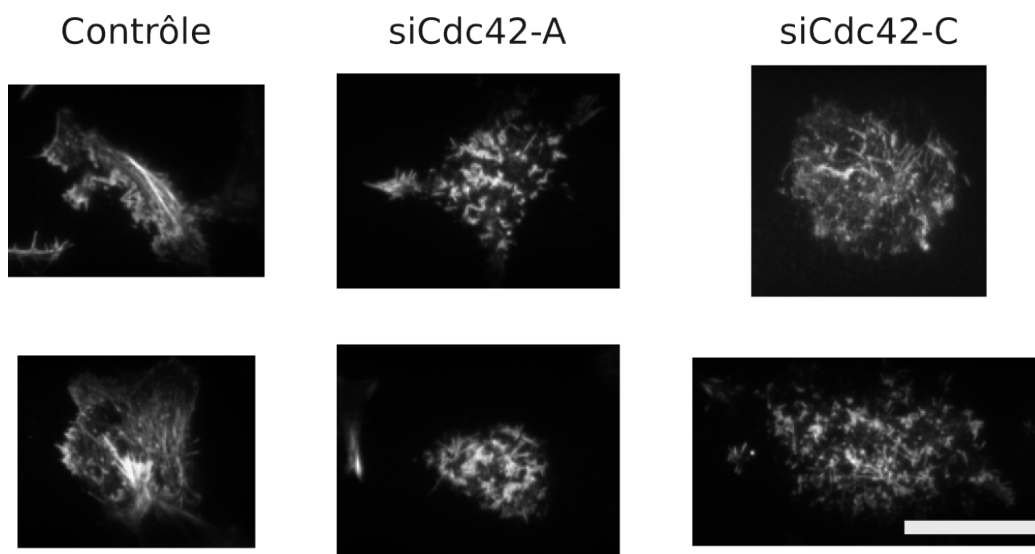


FIGURE 5.2 – Des cellules BON ont été transfectées avec $2\mu\text{g}$ d'un plasmide codant pour Lifeact-GFP et avec un duplex contrôle ou siCdc42-A ou siCdc42-C. Les cellules ont été observées 72h plus tard par imagerie à onde évanescente. Les images ont été acquises avec un temps d'exposition de 100ms. Échelle (identique pour toutes les images) : $10\mu\text{m}$.

Il est très difficile de caractériser ces images et de les comparer objectivement sans analyse quantitative. Cependant, il existe des outils d'analyse des images qui pourraient permettre la caractérisation de la structure de l'actine.

Il existe quelques méthodes décrites dans la littérature basées sur l'analyse fractale du réseau d'actine [Fuseler et al., 2007], le suivi des branches [Ehringer et al., 1999], la formation de groupes ayant des structures et orientation des filaments d'actine similaires [Higaki et al., 2010] ou encore la simulation d'images de fluorescence théoriques à partir de paramètres du cytosquelette qui sont ensuite comparées aux images réelles [Schaub et al., 2007].

La difficulté principale de ce type d'analyse vient de l'obtention de masques représentatifs du cortex d'actine. Pour cela, il est nécessaire d'obtenir des images avec un rapport signal sur bruit et une résolution suffisante pour identifier et analyser des structures dans le cortex d'actine. Le recours à la microscopie super-résolutive ou le développement de logiciels de reconnaissance de structures en filaments pourrait être nécessaire pour cela.

À partir d'un masque, le logiciel *ImageJ* permet de réduire un masque du

réseau d'actine à des lignes d'un pixel de large qui peuvent alors être analysées et quantifiées (il existe un plugin développé par Ignacio Arganda-Carreras) : longueur moyenne des filaments, nombre d'embranchements, nombre d'extrémités. Cette analyse peut également être faite en 3D. Cette approche permettrait la caractérisation et l'analyse quantitative du cortex d'actine donnant des moyens de comparaison précis.

On pourrait alors observer les effets de divers régulateurs (notamment les GTPases) sur la structure du cortex d'actine.

Toutes ces méthodes s'appliquent à l'analyse de la structure statique de l'actine. Il n'existe pas encore de méthode d'analyse d'image dynamique permettant le suivi dans le temps des structures d'actine.

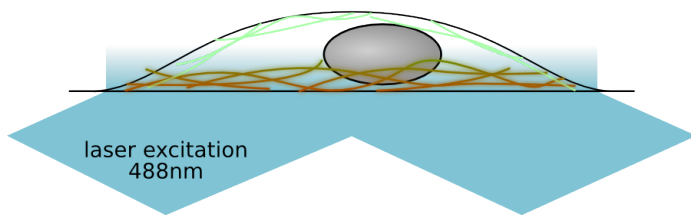
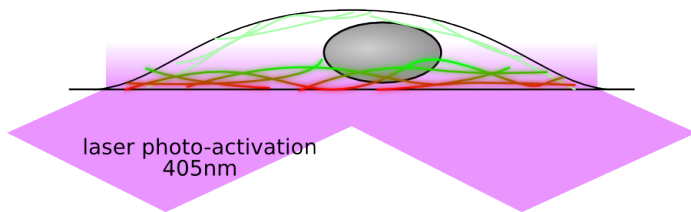
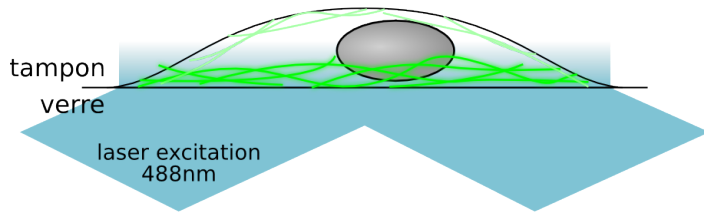
5.4 La dynamique de l'actine

Un des aspects méconnus du cortex d'actine est sa dynamique. Existe-t-il des structures d'actines plus stables que d'autres ? Ces structures pourraient être impliquées dans l'arrimage des granules via Myrip.

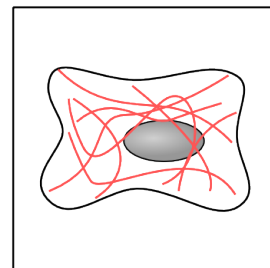
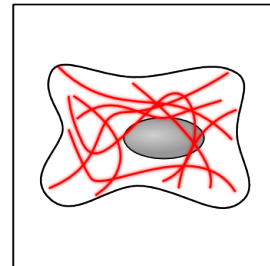
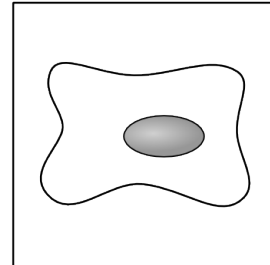
A quel point le cortex est remodelé au repos ? Dans des conditions stimulées ? Ce remodelage pourrait être lié à Cdc42 et à la régulation de la tension de la membrane plasmique.

La photo-activation pourrait fournir un outil puissant pour ce type d'analyse. L'utilisation d'une construction de la fusion de Lifeact et de la Dendra2 pourrait permettre d'analyser la dynamique du cortex d'actine. L'expression de cette construction dans les cellules permet le marquage du cortex d'actine. On peut alors photo-convertir Lifeact-Dendra2 de deux façons différentes.

- Par imagerie à onde évanescente. On peut ensuite observer la perte du signal rouge par diffusion suivant l'axe z .
 - Par Spot Illumination (Rap OptoElectronique) qui permet la photo-conversion d'un cylindre suivant l'axe z de diamètre variable (quelques micromètres à plusieurs dizaines de micro-mètres). On peut alors suivre la diffusion dans le plan (x,y) du signal rouge.
-



CANAL ROUGE



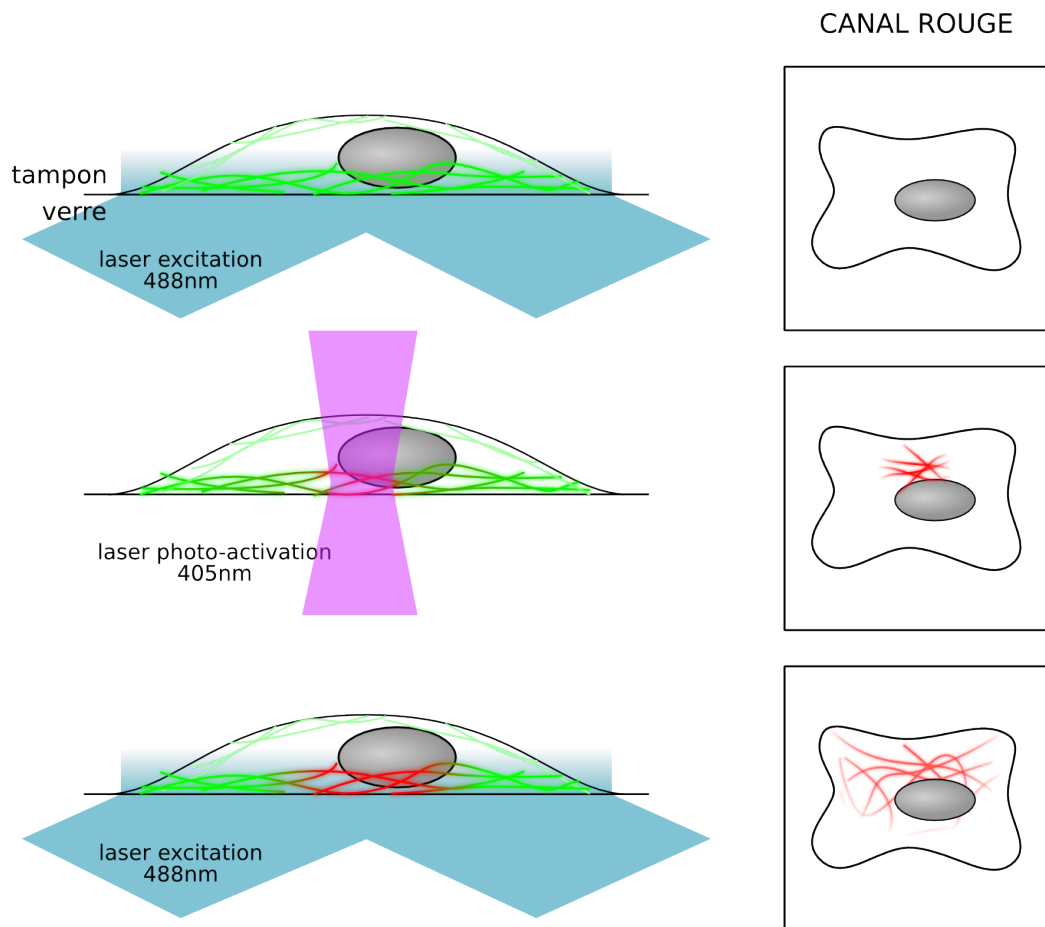


FIGURE 5.3 – Le cortex d’actine est marqué par Lifeact-Dendra2. Elle peut être photo-activée par un laser à 405nm, soit par onde évanescente, soit par SpotIllumination. Le signal diffuse ensuite soit suivant l’axe z, soit dans le plan (x,y). La vitesse de diffusion est liée à la stabilité du cortex d’actine. Dans la colonne de droite, un aperçu de l’image qui pourrait être obtenue par imagerie à onde évanescente.

Le suivi de la décroissance du signal rouge dû à la diffusion du Lifeact-Dendra2 photo-converti dans les filaments permet d’avoir des informations sur la dynamique du cytosquelette et la vitesse de diffusion de Lifeact-Dendra2 dans les filaments probablement liée à la polymérisation / dépolymérisation des filaments.

Cette technique peut-être supérieure aux expériences de récupération de la fluorescence après photo-blanchiment (FRAP) pour la détection de struc-

tures stables. En effet, si on photo-blanchi un réseau d'actine complexe et qu'on suit la récupération de la fluorescence, les structures les plus stables ne réapparaîtront pas. Il sera alors impossible de savoir si c'est dû à la disparition de ces structures par dépolymérisation de l'actine ou si ce sont des structures stables. Par photo-activation, les structures stables sont facilement mises en évidence car elles conservent le signal plus longtemps que les autres structures.

Ces méthodes permettraient d'obtenir de nombreuses informations sur le rôle du cortex d'actine dans l'exocytose, ainsi que sur les mécanismes qui permettent ces fonctions.

ANNEXE A

Bibliographie

Bibliographie

- [Abdel-Latif et al., 2004] Abdel-Latif, D., Steward, M., Macdonald, D. L., Francis, G. A., Dinauer, M. C., and Lacy, P. (2004). Rac2 is critical for neutrophil primary granule exocytosis. *Blood*, 104(3) :832–9.
- [Abderrahmani et al., 2004] Abderrahmani, A., Niederhauser, G., Plaisance, V., Roehrich, M.-E., Lenain, V., Coppola, T., Regazzi, R., and Waeber, G. (2004). Complexin I regulates glucose-induced secretion in pancreatic beta-cells. *Journal of cell science*, 117(Pt 11) :2239–47.
- [Abdulreda et al., 2008] Abdulreda, M. H., Bhalla, A., Chapman, E. R., and Moy, V. T. (2008). Atomic force microscope spectroscopy reveals a hemifusion intermediate during soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptors-mediated membrane fusion. *Biophysical journal*, 94(2) :648–55.
- [Adamo et al., 1999] Adamo, J. E., Rossi, G., and Brennwald, P. (1999). The Rho GTPase Rho3 has a direct role in exocytosis that is distinct from its role in actin polarity. *Molecular biology of the cell*, 10(12) :4121–33.
- [Ahnert-Hilger et al., 1993] Ahnert-Hilger, G., Grube, K., Kvols, L., Lee, I., Mönch, E., Riecken, E. O., Schmitt, L., and Wiedenmann, B. (1993). Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours contain a common set of synaptic vesicle proteins and amino acid neurotransmitters. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 29A(14) :1982–4.
- [Ahras et al., 2006] Ahras, M., Otto, G. P., and Tooze, S. A. (2006). Synaptotagmin IV is necessary for the maturation of secretory granules in PC12 cells. *The Journal of cell biology*, 173(2) :241–51.
- [Albillos et al., 1997] Albillos, a., Dernick, G., Horstmann, H., Almers, W., Alvarez de Toledo, G., and Lindau, M. (1997). The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature*, 389(6650) :509–12.
- [Alés et al., 1999] Alés, E., Tabares, L., Poyato, J. M., Valero, V., Lindau, M., and Alvarez de Toledo, G. (1999). High calcium concentrations shift

- the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism. *Nature cell biology*, 1(1) :40–4.
- [Alexander et al., 2005] Alexander, K., Nikodémová, M., Mária, N., Kuceřová, J., Jana, K., Strbák, V., and Vladimír, S. (2005). Colchicine treatment differently affects releasable thyrotropin-releasing hormone (TRH) pools in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) and the median eminence (ME). *Cellular and molecular neurobiology*, 25(3-4) :681–95.
- [Allersma et al., 2006] Allersma, M. W., Bittner, M. A., Axelrod, D., and Holz, R. W. (2006). Motion Matters : Secretory Granule Motion Adjacent to the Plasma Membrane and Exocytosis. *Molecular Biology of the Cell*, 17(May) :2424 –2438.
- [Alvarez de Toledo et al., 1993] Alvarez de Toledo, G., Fernández-Chacón, R., and Fernández, J. M. (1993). Release of secretory products during transient vesicle fusion. *Nature*, 363(6429) :554–8.
- [a.M. Aravanis et al., 2003] a.M. Aravanis, Pyle, J., Harata, N., and Tsien, R. (2003). Imaging single synaptic vesicles undergoing repeated fusion events : kissing, running, and kissing again. *Neuropharmacology*, 45(6) :797–813.
- [Amatore et al., 2000] Amatore, C., Bouret, Y., Travis, E., and Wightman, R. (2000). Adrenaline Release by Chromaffin Cells : Constrained Swelling of the Vesicle Matrix Leads to Full Fusion. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 39(11) :1952–1955.
- [Amieva and Furthmayr, 1995] Amieva, M. R. and Furthmayr, H. (1995). Subcellular localization of moesin in dynamic filopodia, retraction fibers, and other structures involved in substrate exploration, attachment, and cell-cell contacts. *Experimental cell research*, 219(1) :180–96.
- [An et al., 2010] An, S. J., Grabner, C. P., and Zenisek, D. (2010). Real-time visualization of complexin during single exocytic events. *Nature neuroscience*, 13(5) :577–83.
- [Anantharam et al., 2011] Anantharam, A., Bittner, M. A., Aikman, R. L., Stuenkel, E. L., Schmid, S. L., Axelrod, D., and Holz, R. W. (2011). A new

- role for the dynamin GTPase in the regulation of fusion pore expansion. *Molecular Biology of the Cell*, 22(11) :1907–1918.
- [Anantharam et al., 2010] Anantharam, A., Onoa, B., Edwards, R. H., Holz, R. W., and Axelrod, D. (2010). Localized topological changes of the plasma membrane upon exocytosis visualized by polarized TIRFM. *The Journal of cell biology*, 188(3) :415–28.
- [Angleton et al., 1999] Angleton, J. K., Cochilla, A. J., Kilic, G., Nussinovitch, I., and Betz, W. J. (1999). Regulation of dense core release from neuroendocrine cells revealed by imaging single exocytic events. *Nature neuroscience*, 2(5) :440–6.
- [Anhert-Hilger et al., 1996] Anhert-Hilger, G., Stadtbäumer, a., Strübing, C., Scherübl, H., Schultz, G., Riecken, E. O., and Wiedenmann, B. (1996). gamma-Aminobutyric acid secretion from pancreatic neuroendocrine cells. *Gastroenterology*, 110(5) :1595–604.
- [Aoki et al., 2010] Aoki, R., Kitaguchi, T., Oya, M., Yanagihara, Y., Sato, M., Miyawaki, A., and Tsuboi, T. (2010). Duration of fusion pore opening and the amount of hormone released are regulated by myosin II during kiss-and-run exocytosis. *The Biochemical journal*, 429(3) :497–504.
- [Aoyagi et al., 2005] Aoyagi, K., Sugaya, T., Umeda, M., Yamamoto, S., Terakawa, S., and Takahashi, M. (2005). The activation of exocytotic sites by the formation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate microdomains at syntaxin clusters. *The Journal of biological chemistry*, 280(17) :17346–52.
- [Araç et al., 2006] Araç, D., Chen, X., Khant, H. a., Ubach, J., Ludtke, S. J., Kikkawa, M., Johnson, A. E., Chiu, W., Südhof, T. C., and Rizo, J. (2006). Close membrane-membrane proximity induced by Ca(2+)-dependent multivalent binding of synaptotagmin-1 to phospholipids. *Nature structural & molecular biology*, 13(3) :209–17.
- [Archer et al., 2002] Archer, D. a., Graham, M. E., and Burgoyne, R. D. (2002). Complexin regulates the closure of the fusion pore during regulated vesicle exocytosis. *The Journal of biological chemistry*, 277(21) :18249–52.

- [Artalejo et al., 2002] Artalejo, C. R., Elhamdani, A., and Palfrey, H. C. (2002). Sustained stimulation shifts the mechanism of endocytosis from dynamin-1-dependent rapid endocytosis to clathrin- and dynamin-2-mediated slow endocytosis in chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(9) :6358–63.
- [Artalejo et al., 1995] Artalejo, C. R., Henley, J. R., McNiven, M. a., and Palfrey, H. C. (1995). Rapid endocytosis coupled to exocytosis in adrenal chromaffin cells involves Ca^{2+} , GTP, and dynamin but not clathrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(18) :8328–32.
- [Arvan and Castle, 1998] Arvan, P. and Castle, D. (1998). Sorting and storage during secretory granule biogenesis : looking backward and looking forward. *The Biochemical journal*, 332 (Pt 3 :593–610.
- [Ashery et al., 2009] Ashery, U., Bielopolski, N., Barak, B., and Yizhar, O. (2009). Friends and foes in synaptic transmission : the role of tomosyn in vesicle priming. *Trends in neurosciences*, 32(5) :275–82.
- [Ashery et al., 2000] Ashery, U., Varoqueaux, F., Voets, T., Betz, A., Thakur, P., Koch, H., Neher, E., Brose, N., and Rettig, J. (2000). Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells. *The EMBO journal*, 19(14) :3586–96.
- [Assadi et al., 2004] Assadi, M., Sharpe, J. C., Snell, C., and Loh, Y. P. (2004). The C-terminus of prohormone convertase 2 is sufficient and necessary for Raft association and sorting to the regulated secretory pathway. *Biochemistry*, 43(24) :7798–807.
- [Augustin et al., 1999] Augustin, I., Rosenmund, C., Südhof, T. C., and Brose, N. (1999). Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature*, 400(6743) :457–61.
- [Augustine and Neher, 1992] Augustine, G. J. and Neher, E. (1992). Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. *The Journal of physiology*, 450 :247–71.

- [Aunis and Bader, 1988] Aunis, D. and Bader, M. F. (1988). The cytoskeleton as a barrier to exocytosis in secretory cells. *The Journal of experimental biology*, 139 :253–66.
- [Axelrod, 1981] Axelrod, D. (1981). Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *The Journal of cell biology*, 89(1) :141–5.
- [Azioune et al., 2011] Azioune, A., Carpi, N., Fink, J., Chehimi, M. M., Cuvelier, D., and Piel, M. (2011). Robust method for high-throughput surface patterning of deformable substrates. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 27(12) :7349–52.
- [Azioune et al., 2010] Azioune, A., Carpi, N., Tseng, Q., Théry, M., and Piel, M. (2010). Protein micropatterns : A direct printing protocol using deep UVs. *Methods in cell biology*, 97 :133–46.
- [Baba et al., 2005] Baba, T., Sakisaka, T., Mochida, S., and Takai, Y. (2005). PKA-catalyzed phosphorylation of tomosyn and its implication in Ca²⁺-dependent exocytosis of neurotransmitter. *The Journal of cell biology*, 170(7) :1113–25.
- [Bader et al., 2004] Bader, M.-F., Doussau, F., Chasserot-Golaz, S., Vitale, N., and Gasman, S. (2004). Coupling actin and membrane dynamics during calcium-regulated exocytosis : a role for Rho and ARF GTPases. *Biochimica et biophysica acta*, 1742(1-3) :37–49.
- [Balaji and Ryan, 2007] Balaji, J. and Ryan, T. a. (2007). Single-vesicle imaging reveals that synaptic vesicle exocytosis and endocytosis are coupled by a single stochastic mode. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(51) :20576–81.
- [Banerjee et al., 1996] Banerjee, A., Barry, V. A., DasGupta, B. R., and Martin, T. F. (1996). N-Ethylmaleimide-sensitive factor acts at a pre-fusion ATP-dependent step in Ca²⁺-activated exocytosis. *The Journal of biological chemistry*, 271(34) :20223–6.
- [Baumert et al., 1989] Baumert, M., Maycox, P. R., Navone, F., De Camilli, P., and Jahn, R. (1989). Synaptobrevin : an integral membrane protein of

- 18,000 daltons present in small synaptic vesicles of rat brain. *The EMBO journal*, 8(2) :379–84.
- [Becherer et al., 2007] Becherer, U., Pasche, M., Nofal, S., Hof, D., Matti, U., and Rettig, J. (2007). Quantifying exocytosis by combination of membrane capacitance measurements and total internal reflection fluorescence microscopy in chromaffin cells. *PloS one*, 2(6) :e505.
- [Becherer and Rettig, 2006] Becherer, U. and Rettig, J. (2006). Vesicle pools, docking, priming, and release. *Cell and tissue research*, 326(2) :393–407.
- [Bello et al., 2012] Bello, O. D., Zanetti, M. N., Mayorga, L. S., and Michaut, M. A. (2012). RIM, Munc13, and Rab3A interplay in acrosomal exocytosis. *Experimental cell research*, 318(5) :478–88.
- [Bennett et al., 1992] Bennett, M. K., Calakos, N., and Scheller, R. H. (1992). Syntaxin : a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science (New York, N.Y.)*, 257(5067) :255–9.
- [Berberian et al., 2009] Berberian, K., Torres, A. J., Fang, Q., Kisler, K., and Lindau, M. (2009). F-actin and myosin II accelerate catecholamine release from chromaffin granules. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(3) :863–70.
- [Berezuk and Schroer, 2007] Berezuk, M. A. and Schroer, T. A. (2007). Dy-nactin enhances the processivity of kinesin-2. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 8(2) :124–9.
- [Betz et al., 1997] Betz, A., Okamoto, M., Benseler, F., and Brose, N. (1997). Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin. *The Journal of biological chemistry*, 272(4) :2520–6.
- [Bhat and Thorn, 2009] Bhat, P. and Thorn, P. (2009). Myosin 2 maintains an open exocytic fusion pore in secretory epithelial cells. *Molecular biology of the cell*, 20(6) :1795–803.
- [Bianchi et al., 2009] Bianchi, V., Farisello, P., Baldelli, P., Meskenaite, V., Milanese, M., Vecellio, M., Mühlemann, S., Lipp, H. P., Bonanno, G., Benfenati, F., Toniolo, D., and D’Adamo, P. (2009). Cognitive impairment

- in Gdi1-deficient mice is associated with altered synaptic vesicle pools and short-term synaptic plasticity, and can be corrected by appropriate learning training. *Human molecular genetics*, 18(1) :105–17.
- [Block et al., 1988] Block, M. R., Glick, B. S., Wilcox, C. A., Wieland, F. T., and Rothman, J. E. (1988). Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(21) :7852–6.
- [Bond et al., 2011] Bond, L. M., Peden, A. A., Kendrick-Jones, J., Sellers, J. R., and Buss, F. (2011). Myosin VI and its binding partner optineurin are involved in secretory vesicle fusion at the plasma membrane. *Molecular biology of the cell*, 22(1) :54–65.
- [Borisovska et al., 2005] Borisovska, M., Zhao, Y., Tsytsyura, Y., Glyvuk, N., Takamori, S., Matti, U., Rettig, J., Südhof, T., and Bruns, D. (2005). v-SNAREs control exocytosis of vesicles from priming to fusion. *The EMBO journal*, 24(12) :2114–26.
- [Boulant et al., 2011] Boulant, S., Kural, C., Zeeh, J.-C., Ubelmann, F., and Kirchhausen, T. (2011). Actin dynamics counteract membrane tension during clathrin-mediated endocytosis. *Nature cell biology*, 13(9) :1124–31.
- [Brandhorst et al., 2006] Brandhorst, D., Zwillig, D., Rizzoli, S. O., Lippert, U., Lang, T., and Jahn, R. (2006). Homotypic fusion of early endosomes : SNAREs do not determine fusion specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8) :2701–6.
- [Brechler et al., 1996] Brechler, V., Chu, W. N., Baxter, J. D., Thibault, G., and Reudelhuber, T. L. (1996). A protease processing site is essential for prorenin sorting to the regulated secretory pathway. *The Journal of biological chemistry*, 271(34) :20636–40.
- [Breckenridge and Almers, 1987a] Breckenridge, L. J. and Almers, W. (1987a). Currents through the fusion pore that forms during exocytosis of a secretory vesicle. *Nature*, 328(6133) :814–7.
- [Breckenridge and Almers, 1987b] Breckenridge, L. J. and Almers, W. (1987b). Final steps in exocytosis observed in a cell with giant secretory

- granules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(7) :1945–9.
- [Broadie et al., 1995] Broadie, K., Prokop, A., Bellen, H. J., O’Kane, C. J., Schulze, K. L., and Sweeney, S. T. (1995). Syntaxin and synaptobrevin function downstream of vesicle docking in *Drosophila*. *Neuron*, 15(3) :663–73.
- [Brochier et al., 1993] Brochier, G., Israël, M., and Lesbats, B. (1993). Immunolabelling of the presynaptic membrane of Torpedo electric organ nerve terminals with an antiserum towards the acetylcholine releasing protein mediatoaphore. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 78(3) :145–54.
- [Brownfield et al., 1985] Brownfield, M. S., Poff, B. C., and Holzwarth, M. A. (1985). Ultrastructural immunocytochemical co-localization of serotonin and PNMT in adrenal medullary vesicles. *Histochemistry*, 83(1) :41–6.
- [Brunger, 2005] Brunger, A. T. (2005). Structure and function of SNARE and SNARE-interacting proteins. *Quarterly reviews of biophysics*, 38(1) :1–47.
- [Brymora et al., 2001] Brymora, A., Valova, V. A., Larsen, M. R., Roufogalis, B. D., and Robinson, P. J. (2001). The brain exocyst complex interacts with RalA in a GTP-dependent manner : identification of a novel mammalian Sec3 gene and a second Sec15 gene. *The Journal of biological chemistry*, 276(32) :29792–7.
- [Bugyi and Carlier, 2010] Bugyi, B. and Carlier, M.-F. (2010). Control of actin filament treadmilling in cell motility. *Annual review of biophysics*, 39 :449–70.
- [Bundgaard et al., 2004] Bundgaard, J. R., Birkedal, H., and Rehfeld, J. F. (2004). Progastrin is directed to the regulated secretory pathway by synergistically acting basic and acidic motifs. *The Journal of biological chemistry*, 279(7) :5488–93.
- [Buss et al., 2004] Buss, F., Spudich, G., and Kendrick-Jones, J. (2004). Myosin VI : cellular functions and motor properties. *Annual review of cell and developmental biology*, 20 :649–76.

- [Cai et al., 2008] Cai, H., Reim, K., Varoqueaux, F., Tapechum, S., Hill, K., Sørensen, J. B., Brose, N., and Chow, R. H. (2008). Complexin II plays a positive role in Ca²⁺-triggered exocytosis by facilitating vesicle priming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(49) :19538–43.
- [Carmichael, 1983] Carmichael, S. W. (1983). The adrenal chromaffin vesicle : an historical perspective. *Journal of the autonomic nervous system*, 7(1) :7–12.
- [Cavadas et al., 2006] Cavadas, C., Céfai, D., Rosmaninho-Salgado, J., Vieira-Coelho, M. A., Moura, E., Busso, N., Pedrazzini, T., Grand, D., Rotman, S., Waeber, B., Aubert, J.-F., and Grouzmann, E. (2006). Deletion of the neuropeptide Y (NPY) Y1 receptor gene reveals a regulatory role of NPY on catecholamine synthesis and secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(27) :10497–502.
- [Cavadas et al., 2002] Cavadas, C., Silva, A., Cotrim, M., Ribeiro, C., Brunner, H., and Grouzmann, E. (2002). Differential secretion of catecholamine and neuropeptide Y in response to KCl from mice chromaffin cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 971(1) :335–337.
- [Ceccarelli et al., 1973] Ceccarelli, B., Hurlbut, W. P., and Mauro, A. (1973). Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *The Journal of cell biology*, 57(2) :499–524.
- [Chan et al., 2003] Chan, S.-A., Chow, R., and Smith, C. (2003). Calcium dependence of action potential-induced endocytosis in chromaffin cells. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 445(5) :540–6.
- [Chan et al., 2010] Chan, S.-A., Doreian, B., and Smith, C. (2010). Dynamin and myosin regulate differential exocytosis from mouse adrenal chromaffin cells. *Cellular and molecular neurobiology*, 30(8) :1351–7.
- [Chanat and Huttner, 1991] Chanat, E. and Huttner, W. B. (1991). Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the trans-Golgi network. *The Journal of cell biology*, 115(6) :1505–19.

- [Chanat et al., 1993] Chanat, E., Weiss, U., Huttner, W. B., and Tooze, S. A. (1993). Reduction of the disulfide bond of chromogranin B (secretogranin I) in the trans-Golgi network causes its missorting to the constitutive secretory pathways. *The EMBO journal*, 12(5) :2159–68.
- [Chandler and Heuser, 1980] Chandler, D. E. and Heuser, J. E. (1980). Arrest of membrane fusion events in mast cells by quick-freezing. *The Journal of cell biology*, 86(2) :666–74.
- [Chanturiya et al., 1997] Chanturiya, A., Chernomordik, L. V., and Zimmerberg, J. (1997). Flickering fusion pores comparable with initial exocytotic pores occur in protein-free phospholipid bilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(26) :14423–8.
- [Chasserot-Golaz et al., 2010] Chasserot-Golaz, S., Coorsen, J. R., Meunier, F. A., and Vitale, N. (2010). Lipid dynamics in exocytosis. *Cellular and molecular neurobiology*, 30(8) :1335–42.
- [Chen et al., 2008] Chen, X., Barg, S., and Almers, W. (2008). Release of the styryl dyes from single synaptic vesicles in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(8) :1894–903.
- [Chen et al., 2002] Chen, X., Tomchick, D. R., Kovrigin, E., Araç, D., Machius, M., Südhof, T. C., and Rizo, J. (2002). Three-dimensional structure of the complexin/SNARE complex. *Neuron*, 33(3) :397–409.
- [Chernomordik and Kozlov, 2008] Chernomordik, L. V. and Kozlov, M. M. (2008). Mechanics of membrane fusion. *Nature structural & molecular biology*, 15(7) :675–83.
- [Cheviet et al., 2006] Cheviet, S., Bezzi, P., Ivarsson, R., Renström, E., Viertl, D., Kasas, S., Catsicas, S., and Regazzi, R. (2006). Tomosyn-1 is involved in a post-docking event required for pancreatic beta-cell exocytosis. *Journal of cell science*, 119(Pt 14) :2912–20.
- [Chizmadzhev et al., 2000] Chizmadzhev, Y. A., Kuzmin, P. I., Kumenko, D. A., Zimmerberg, J., and Cohen, F. S. (2000). Dynamics of fusion pores connecting membranes of different tensions. *Biophysical journal*, 78(5) :2241–56.

- [Chow et al., 1992] Chow, R. H., von Rüden, L., and Neher, E. (1992). Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature*, 356(6364) :60–3.
- [Chuan et al., 2011] Chuan, P., Spudich, J. a., and Dunn, A. R. (2011). Robust mechanosensing and tension generation by myosin VI. *Journal of molecular biology*, 405(1) :105–12.
- [Coleman et al., 2007] Coleman, W. L., Bill, C. A., and Bykhovskaia, M. (2007). Rab3a deletion reduces vesicle docking and transmitter release at the mouse diaphragm synapse. *Neuroscience*, 148(1) :1–6.
- [Colicos et al., 2001] Colicos, M. A., Collins, B. E., Sailor, M. J., and Goda, Y. (2001). Remodeling of synaptic actin induced by photoconductive stimulation. *Cell*, 107(5) :605–16.
- [Colomer et al., 1996] Colomer, V., Kicska, G. A., and Rindler, M. J. (1996). Secretory granule content proteins and the luminal domains of granule membrane proteins aggregate in vitro at mildly acidic pH. *The Journal of biological chemistry*, 271(1) :48–55.
- [Cool and Loh, 1998] Cool, D. R. and Loh, Y. P. (1998). Carboxypeptidase E is a sorting receptor for prohormones : binding and kinetic studies. *Molecular and cellular endocrinology*, 139(1-2) :7–13.
- [Coupland, 1965] Coupland, R. E. (1965). Electron microscopic observations on the structure of the rat adrenal medulla : II. Normal innervation. *Journal of Anatomy*, 99(Pt 2) :255–272.
- [Crivellato et al., 2008] Crivellato, E., Nico, B., and Ribatti, D. (2008). The chromaffin vesicle : advances in understanding the composition of a versatile, multifunctional secretory organelle. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)*, 291(12) :1587–602.
- [Cuchillo-Ibanez et al., 2002] Cuchillo-Ibanez, I., Albillos, A., Aldea, M., Arroyo, G., Fuentealba, J., and Garcia, A. G. (2002). Calcium entry, calcium redistribution, and exocytosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 971 :108–16.
- [D’Adamo et al., 1998] D’Adamo, P., Menegon, A., Lo Nigro, C., Grasso, M., Gulisano, M., Tamanini, F., Bienvenu, T., Gedeon, A. K., Oostra, B., Wu,

- S. K., Tandon, A., Valtorta, F., Balch, W. E., Chelly, J., and Toniolo, D. (1998). Mutations in GDI1 are responsible for X-linked non-specific mental retardation. *Nature genetics*, 19(2) :134–9.
- [D’Adamo et al., 2002] D’Adamo, P., Welzl, H., Papadimitriou, S., Raffaele di Barletta, M., Tiveron, C., Tatangelo, L., Pozzi, L., Chapman, P. F., Knevett, S. G., Ramsay, M. F., Valtorta, F., Leoni, C., Menegon, A., Wolfer, D. P., Lipp, H.-P., and Toniolo, D. (2002). Deletion of the mental retardation gene Gdil impairs associative memory and alters social behavior in mice. *Human molecular genetics*, 11(21) :2567–80.
- [Dai et al., 2007] Dai, H., Shen, N., Araç, D., and Rizo, J. (2007). A quaternary SNARE-synaptotagmin-Ca²⁺-phospholipid complex in neurotransmitter release. *Journal of molecular biology*, 367(3) :848–63.
- [Daily et al., 2010] Daily, N. J., Boswell, K. L., James, D. J., and Martin, T. F. J. (2010). Novel interactions of CAPS (Ca²⁺-dependent activator protein for secretion) with the three neuronal SNARE proteins required for vesicle fusion. *The Journal of biological chemistry*, 285(46) :35320–9.
- [Darchen and Desnos, 2012] Darchen, F. and Desnos, C. (2012). Masterclass with Rab3 and Rab27 : Orchestrating Regulated Secretion. In Descartes, C. P., editor, *Rab GTPases and Membrane Trafficking*, pages 55–76, Paris.
- [Das et al., 2012] Das, M., Drake, T., Wiley, D. J., Buchwald, P., Vavylonis, D., and Verde, F. (2012). Oscillatory Dynamics of Cdc42 GTPase in the Control of Polarized Growth. *Science (New York, N.Y.)*, 239.
- [de Forges et al., 2012] de Forges, H., Bouissou, A., and Perez, F. (2012). Interplay between microtubule dynamics and intracellular organization. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(2) :266–74.
- [de Wit, 2010] de Wit, H. (2010). Morphological docking of secretory vesicles. *Histochemistry and cell biology*, 134(2) :103–13.
- [de Wit et al., 2006] de Wit, H., Cornelisse, L. N., Toonen, R. F. G., and Verhage, M. (2006). Docking of secretory vesicles is syntaxin dependent. *PloS one*, 1 :e126.
- [de Wit et al., 2009] de Wit, H., Walter, A. M., Milosevic, I., Gulyás-Kovács, A., Riedel, D., Sørensen, J. B., and Verhage, M. (2009). Synaptotagmin-1

- docks secretory vesicles to syntaxin-1/SNAP-25 acceptor complexes. *Cell*, 138(5) :935–46.
- [Desnos et al., 2007a] Desnos, C., Huet, S., and Darchen, F. (2007a). 'Should I stay or should I go?' : myosin V function in organelle trafficking. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 99(8) :411–23.
- [Desnos et al., 2007b] Desnos, C., Huet, S., Fanget, I., Chapuis, C., Böttiger, C., Racine, V., Sibarita, J.-B., Henry, J.-P., and Darchen, F. (2007b). Myosin va mediates docking of secretory granules at the plasma membrane. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(39) :10636–45.
- [Desnos et al., 2003] Desnos, C., Schonn, J.-S., Huet, S., Tran, V. S., El-Amraoui, A., Raposo, G., Fanget, I., Chapuis, C., Ménasché, G., de Saint Basile, G., Petit, C., Cribier, S., Henry, J.-P., and Darchen, F. (2003). Rab27A and its effector MyRIP link secretory granules to F-actin and control their motion towards release sites. *The Journal of cell biology*, 163(3) :559–70.
- [Dhanvantari et al., 2002] Dhanvantari, S., Arnaoutova, I., Snell, C. R., Steinbach, P. J., Hammond, K., Caputo, G. A., London, E., and Loh, Y. P. (2002). Carboxypeptidase E, a prohormone sorting receptor, is anchored to secretory granules via a C-terminal transmembrane insertion. *Biochemistry*, 41(1) :52–60.
- [Di Giovanni et al., 2010] Di Giovanni, J., Boudkkazi, S., Mochida, S., Bielowas, A., Samari, N., Lévêque, C., Youssouf, F., Brechet, A., Iborra, C., Maulet, Y., Moutot, N., Debanne, D., Seagar, M., and El Far, O. (2010). V-ATPase membrane sector associates with synaptobrevin to modulate neurotransmitter release. *Neuron*, 67(2) :268–79.
- [Dikeakos et al., 2007] Dikeakos, J. D., Lacombe, M.-J., Mercure, C., Mi-reuta, M., and Reudelhuber, T. L. (2007). A hydrophobic patch in a charged alpha-helix is sufficient to target proteins to dense core secretory granules. *The Journal of biological chemistry*, 282(2) :1136–43.

- [Dikeakos and Reudelhuber, 2007] Dikeakos, J. D. and Reudelhuber, T. L. (2007). Sending proteins to dense core secretory granules : still a lot to sort out. *The Journal of cell biology*, 177(2) :191–6.
- [Dittie et al., 1996] Dittie, A. S., Hajibagheri, N., and Tooze, S. A. (1996). The AP-1 adaptor complex binds to immature secretory granules from PC12 cells, and is regulated by ADP-ribosylation factor. *The Journal of cell biology*, 132(4) :523–36.
- [Dittié et al., 1999] Dittié, A. S., Klumperman, J., and Tooze, S. A. (1999). Differential distribution of mannose-6-phosphate receptors and furin in immature secretory granules. *Journal of cell science*, 112 (Pt 2 :3955–66.
- [Dittié et al., 1997] Dittié, A. S., Thomas, L., Thomas, G., and Tooze, S. A. (1997). Interaction of furin in immature secretory granules from neuroendocrine cells with the AP-1 adaptor complex is modulated by casein kinase II phosphorylation. *The EMBO journal*, 16(16) :4859–70.
- [Doreian et al., 2009] Doreian, B. W., Fulop, T. G., Meklemburg, R. L., and Smith, C. B. (2009). Cortical F-actin, the exocytic mode, and neuropeptide release in mouse chromaffin cells is regulated by myristoylated alanine-rich C-kinase substrate and myosin II. *Molecular biology of the cell*, 20(13) :3142–54.
- [Doreian et al., 2008] Doreian, B. W., Fulop, T. G., and Smith, C. B. (2008). Myosin II activation and actin reorganization regulate the mode of quantal exocytosis in mouse adrenal chromaffin cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(17) :4470–8.
- [Douglas and Rubin, 1961] Douglas, W. W. and Rubin, R. P. (1961). Mechanism of nicotinic action at the adrenal medulla : calcium as a link in stimulus-secretion coupling. *Nature*, 192 :1087–9.
- [Doussau et al., 2000] Doussau, F., Gasman, S., Humeau, Y., Vitiello, F., Poppoff, M., Boquet, P., Bader, M. F., and Poulain, B. (2000). A Rho-related GTPase is involved in Ca(2+)-dependent neurotransmitter exocytosis. *The Journal of biological chemistry*, 275(11) :7764–70.
- [Dulubova et al., 2007] Dulubova, I., Khvotchev, M., Liu, S., Huryeva, I., Südhof, T. C., and Rizo, J. (2007). Munc18-1 binds directly to the neuronal

- SNARE complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(8) :2697–702.
- [Dunant and Israël, 2000] Dunant, Y. and Israël, M. (2000). Neurotransmitter release at rapid synapses. *Biochimie*, 82(4) :289–302.
- [Dybbs et al., 2005] Dybbs, M., Ngai, J., and Kaplan, J. M. (2005). Using microarrays to facilitate positional cloning : identification of tomosyn as an inhibitor of neurosecretion. *PLoS genetics*, 1(1) :6–16.
- [Eaton et al., 2000] Eaton, B. A., Haugwitz, M., Lau, D., and Moore, H. P. (2000). Biogenesis of regulated exocytotic carriers in neuroendocrine cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(19) :7334–44.
- [Ehringer et al., 1999] Ehringer, W. D., Yamany, S., Steier, K., Farag, A., Roisen, F. J., Dozier, A., and Miller, F. N. (1999). Quantitative image analysis of F-actin in endothelial cells. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 6(4) :291–303.
- [El-Amraoui et al., 2002] El-Amraoui, A., Schonh, J.-S., Küssel-Andermann, P., Blanchard, S., Desnos, C., Henry, J.-P., Wolfrum, U., Darchen, F., and Petit, C. (2002). MyRIP, a novel Rab effector, enables myosin VIIa recruitment to retinal melanosomes. *EMBO reports*, 3(5) :463–70.
- [Elhamdani et al., 2006] Elhamdani, A., Azizi, F., and Artalejo, C. R. (2006). Double patch clamp reveals that transient fusion (kiss-and-run) is a major mechanism of secretion in calf adrenal chromaffin cells : high calcium shifts the mechanism from kiss-and-run to complete fusion. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(11) :3030–6.
- [Elhamdani et al., 2001] Elhamdani, A., Palfrey, H. C., and Artalejo, C. R. (2001). Quantal size is dependent on stimulation frequency and calcium entry in calf chromaffin cells. *Neuron*, 31(5) :819–30.
- [Elias et al., 2010] Elias, S., Delestre, C., Courel, M., Anouar, Y., and Montero-Hadjadje, M. (2010). Chromogranin A as a crucial factor in the sorting of peptide hormones to secretory granules. *Cellular and molecular neurobiology*, 30(8) :1189–95.

- [Elstak et al., 2011] Elstak, E. D., Neeft, M., Nehme, N. T., Voortman, J., Cheung, M., Goodarzifard, M., Gerritsen, H. C., van Bergen En Henegouwen, P. M. P., Callebaut, I., de Saint Basile, G., and van der Sluijs, P. (2011). The munc13-4-rab27 complex is specifically required for tethering secretory lysosomes at the plasma membrane. *Blood*, 118(6) :1570–8.
- [Espreafico et al., 1992] Espreafico, E. M., Cheney, R. E., Matteoli, M., Nascimben, A. A., De Camilli, P. V., Larson, R. E., and Mooseker, M. S. (1992). Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *The Journal of cell biology*, 119(6) :1541–57.
- [Evers et al., 1991] Evers, B. M., Townsend, C. M., Upp, J. R., Allen, E., Hurlbut, S. C., Kim, S. W., Rajaraman, S., Singh, P., Reubi, J. C., and Thompson, J. C. (1991). Establishment and characterization of a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth. *Gastroenterology*, 101(2) :303–11.
- [Fasshauer et al., 1999] Fasshauer, D., Antonin, W., Margittai, M., Pabst, S., and Jahn, R. (1999). Mixed and non-cognate SNARE complexes. Characterization of assembly and biophysical properties. *The Journal of biological chemistry*, 274(22) :15440–6.
- [Fasshauer et al., 2002] Fasshauer, D., Antonin, W., Subramaniam, V., and Jahn, R. (2002). SNARE assembly and disassembly exhibit a pronounced hysteresis. *Nature structural biology*, 9(2) :144–51.
- [Fasshauer et al., 1997a] Fasshauer, D., Bruns, D., Shen, B., Jahn, R., and Brünger, A. T. (1997a). A structural change occurs upon binding of syntaxin to SNAP-25. *The Journal of biological chemistry*, 272(7) :4582–90.
- [Fasshauer et al., 1998] Fasshauer, D., Eliason, W. K., Brünger, A. T., and Jahn, R. (1998). Identification of a minimal core of the synaptic SNARE complex sufficient for reversible assembly and disassembly. *Biochemistry*, 37(29) :10354–62.
- [Fasshauer et al., 1997b] Fasshauer, D., Otto, H., Eliason, W. K., Jahn, R., and Brünger, A. T. (1997b). Structural changes are associated with soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor

- complex formation. *The Journal of biological chemistry*, 272(44) :28036–41.
- [Feldmann et al., 2003] Feldmann, J., Callebaut, I., Raposo, G., Certain, S., Bacq, D., Dumont, C., Lambert, N., Ouachée-Chardin, M., Chedeville, G., Tamary, H., Minard-Colin, V., Vilmer, E., Blanche, S., Le Deist, F., Fischer, A., and de Saint Basile, G. (2003). Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell*, 115(4) :461–73.
- [Felicangeli et al., 2001] Felicangeli, S., Kitabgi, P., and Bidard, J. N. (2001). The role of dibasic residues in prohormone sorting to the regulated secretory pathway. A study with proneurotensin. *The Journal of biological chemistry*, 276(9) :6140–50.
- [Felmy, 2009] Felmy, F. (2009). Actin and dynamin recruitment and the lack thereof at exo- and endocytotic sites in PC12 cells. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 458(2) :403–17.
- [Fernandez et al., 1997] Fernandez, C. J., Haugwitz, M., Eaton, B., and Moore, H. P. (1997). Distinct molecular events during secretory granule biogenesis revealed by sensitivities to brefeldin A. *Molecular biology of the cell*, 8(11) :2171–85.
- [Fernandez et al., 1984] Fernandez, J. M., Neher, E., and Gomperts, B. D. (1984). Capacitance measurements reveal stepwise fusion events in degranulating mast cells. *Nature*, 312(5993) :453–5.
- [Fernández-Busnadiego et al., 2010] Fernández-Busnadiego, R., Zuber, B., Maurer, U. E., Cyrklaff, M., Baumeister, W., and Lucic, V. (2010). Quantitative analysis of the native presynaptic cytomatrix by cryoelectron tomography. *The Journal of cell biology*, 188(1) :145–56.
- [Fernández-Chacón and Alvarez de Toledo, 1995] Fernández-Chacón, R. and Alvarez de Toledo, G. (1995). Cytosolic calcium facilitates release of secretory products after exocytotic vesicle fusion. *FEBS letters*, 363(3) :221–5.
- [Fernández-Chacón et al., 2001] Fernández-Chacón, R., Königstorfer, A., Gerber, S. H., García, J., Matos, M. F., Stevens, C. F., Brose, N., Rizo,

- J., Rosenmund, C., and Südhof, T. C. (2001). Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature*, 410(6824) :41–9.
- [Ferro-Novick and Jahn, 1994] Ferro-Novick, S. and Jahn, R. (1994). Vesicle fusion from yeast to man. *Nature*, 370(6486) :191–3.
- [Fischer-Colbrie et al., 1986] Fischer-Colbrie, R., Diez-Guerra, J., Emson, P. C., and Winkler, H. (1986). Bovine chromaffin granules : immunological studies with antisera against neuropeptide Y, [Met]enkephalin and bombesin. *Neuroscience*, 18(1) :167–74.
- [Frantz et al., 2002] Frantz, C., Coppola, T., and Regazzi, R. (2002). Involvement of Rho GTPases and their effectors in the secretory process of PC12 cells. *Experimental cell research*, 273(2) :119–26.
- [Fujita et al., 2007] Fujita, Y., Xu, A., Xie, L., Arunachalam, L., Chou, T.-C., Jiang, T., Chiew, S.-K., Kourtesis, J., Wang, L., Gaisano, H. Y., and Sugita, S. (2007). Ca²⁺-dependent activator protein for secretion 1 is critical for constitutive and regulated exocytosis but not for loading of transmitters into dense core vesicles. *The Journal of biological chemistry*, 282(29) :21392–403.
- [Fukasawa et al., 2004] Fukasawa, M., Varlamov, O., Eng, W. S., Söllner, T. H., and Rothman, J. E. (2004). Localization and activity of the SNARE Ykt6 determined by its regulatory domain and palmitoylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(14) :4815–20.
- [Fukuda, 2008] Fukuda, M. (2008). Regulation of secretory vesicle traffic by Rab small GTPases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65(18) :2801–13.
- [Fukuda et al., 2002] Fukuda, M., Kanno, E., Saegusa, C., Ogata, Y., and Kuroda, T. S. (2002). Slp4-a/granuphilin-a regulates dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *The Journal of biological chemistry*, 277(42) :39673–8.
- [Fukuda and Kuroda, 2002] Fukuda, M. and Kuroda, T. S. (2002). Slac2-c (synaptotagmin-like protein homologue lacking C2 domains-c), a novel

- linker protein that interacts with Rab27, myosin Va/VIIa, and actin. *The Journal of biological chemistry*, 277(45) :43096–103.
- [Fukuda et al., 2000] Fukuda, R., McNew, J. A., Weber, T., Parlati, F., Engel, T., Nickel, W., Rothman, J. E., and Söllner, T. H. (2000). Functional architecture of an intracellular membrane t-SNARE. *Nature*, 407(6801) :198–202.
- [Fulop et al., 2005] Fulop, T., Radabaugh, S., and Smith, C. (2005). Activity-dependent differential transmitter release in mouse adrenal chromaffin cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(32) :7324–32.
- [Fulop and Smith, 2006] Fulop, T. and Smith, C. (2006). Physiological stimulation regulates the exocytic mode through calcium activation of protein kinase C in mouse chromaffin cells. *The Biochemical journal*, 399(1) :111–9.
- [Fuseler et al., 2007] Fuseler, J. W., Millette, C. F., Davis, J. M., and Carver, W. (2007). Fractal and image analysis of morphological changes in the actin cytoskeleton of neonatal cardiac fibroblasts in response to mechanical stretch. *Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada*, 13(2) :133–43.
- [Garcia et al., 2005] Garcia, A. L., Han, S.-K., Janssen, W. G., Khaing, Z. Z., Ito, T., Glucksman, M. J., Benson, D. L., and Salton, S. R. J. (2005). A prohormone convertase cleavage site within a predicted alpha-helix mediates sorting of the neuronal and endocrine polypeptide VGF into the regulated secretory pathway. *The Journal of biological chemistry*, 280(50) :41595–608.
- [Gasman et al., 1998] Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., Hubert, P., Aunis, D., and Bader, M. F. (1998). Identification of a potential effector pathway for the trimeric Go protein associated with secretory granules. Go stimulates a granule-bound phosphatidylinositol 4-kinase by activating RhoA in chromaffin cells. *The Journal of biological chemistry*, 273(27) :16913–20.

- [Gasman et al., 2004] Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., Malacombe, M., Way, M., and Bader, M.-F. (2004). Regulated exocytosis in neuroendocrine cells : a role for subplasmalemmal Cdc42/N-WASP-induced actin filaments. *Molecular biology of the cell*, 15(2) :520–31.
- [Gasman et al., 1997] Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., Popoff, M. R., Aunis, D., and Bader, M. F. (1997). Trimeric G proteins control exocytosis in chromaffin cells. Go regulates the peripheral actin network and catecholamine secretion by a mechanism involving the small GTP-binding protein Rho. *The Journal of biological chemistry*, 272(33) :20564–71.
- [Gasman et al., 1999] Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., Popoff, M. R., Aunis, D., and Bader, M. F. (1999). Involvement of Rho GTPases in calcium-regulated exocytosis from adrenal chromaffin cells. *Journal of cell science*, 112 (Pt 2 :4763–71.
- [Gauthier et al., 2011] Gauthier, N. C., Fardin, M. A., Roca-Cusachs, P., and Sheetz, M. P. (2011). Temporary increase in plasma membrane tension coordinates the activation of exocytosis and contraction during cell spreading. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(35) :14467–72.
- [Geppert et al., 1994] Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R. E., Li, C., Rosahl, T. W., Stevens, C. F., and Südhof, T. C. (1994). Synaptotagmin I : a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell*, 79(4) :717–27.
- [Gerdes et al., 1989] Gerdes, H. H., Rosa, P., Phillips, E., Baeuerle, P. A., Frank, R., Argos, P., and Huttner, W. B. (1989). The primary structure of human secretogranin II, a widespread tyrosine-sulfated secretory granule protein that exhibits low pH- and calcium-induced aggregation. *The Journal of biological chemistry*, 264(20) :12009–15.
- [Gill et al., 1991] Gill, S. R., Schroer, T. A., Szilak, I., Steuer, E. R., Sheetz, M. P., and Cleveland, D. W. (1991). Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein. *The Journal of cell biology*, 115(6) :1639–50.

- [Giner et al., 2007] Giner, D., López, I., Villanueva, J., Torres, V., Viniegra, S., and Gutiérrez, L. M. (2007). Vesicle movements are governed by the size and dynamics of F-actin cytoskeletal structures in bovine chromaffin cells. *Neuroscience*, 146(2) :659–69.
- [Giner et al., 2005] Giner, D., Neco, P., Francés, M. d. M., López, I., Viniegra, S., and Gutiérrez, L. M. (2005). Real-time dynamics of the F-actin cytoskeleton during secretion from chromaffin cells. *Journal of cell science*, 118(Pt 13) :2871–80.
- [Giraudo et al., 2005] Giraudo, C. G., Hu, C., You, D., Slovic, A. M., Mosharov, E. V., Sulzer, D., Melia, T. J., and Rothman, J. E. (2005). SNAREs can promote complete fusion and hemifusion as alternative outcomes. *The Journal of cell biology*, 170(2) :249–60.
- [Glombik and Gerdes, 2000] Glombik, M. M. and Gerdes, H. H. (2000). Signal-mediated sorting of neuropeptides and prohormones : secretory granule biogenesis revisited. *Biochimie*, 82(4) :315–26.
- [Glombik et al., 1999] Glombik, M. M., Krömer, A., Salm, T., Huttner, W. B., and Gerdes, H. H. (1999). The disulfide-bonded loop of chromogranin B mediates membrane binding and directs sorting from the trans-Golgi network to secretory granules. *The EMBO journal*, 18(4) :1059–70.
- [Glotzer, 2001] Glotzer, M. (2001). Animal cell cytokinesis. *Annual review of cell and developmental biology*, 17 :351–86.
- [Goehring et al., 2007] Goehring, A. S., Pedroja, B. S., Hinke, S. A., Langeberg, L. K., and Scott, J. D. (2007). MyRIP anchors protein kinase A to the exocyst complex. *The Journal of biological chemistry*, 282(45) :33155–67.
- [Goguen et al., 2011] Goguen, B. N., Loving, G. S., and Imperiali, B. (2011). Development of a fluorogenic sensor for activated Cdc42. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 21(17) :5058–5061.
- [Gomi et al., 2005] Gomi, H., Mizutani, S., Kasai, K., Itohara, S., and Izumi, T. (2005). Granophilin molecularly docks insulin granules to the fusion machinery. *The Journal of cell biology*, 171(1) :99–109.
- [Gomi et al., 2007] Gomi, H., Mori, K., Itohara, S., and Izumi, T. (2007). Rab27b is expressed in a wide range of exocytic cells and involved in the

- delivery of secretory granules near the plasma membrane. *Molecular biology of the cell*, 18(11) :4377–86.
- [Goos and Hänchen, 1947] Goos, F. and Hänchen, H. (1947). Ein neuer und fundamentaler Versuch zur Totalreflexion. *Annalen der Physik*, 436(7-8) :333–346.
- [Gorr et al., 1989] Gorr, S. U., Shioi, J., and Cohn, D. V. (1989). Interaction of calcium with porcine adrenal chromogranin A (secretory protein-I) and chromogranin B (secretogranin I). *The American journal of physiology*, 257(2 Pt 1) :E247–54.
- [Goumon et al., 2000] Goumon, Y., Zhu, W., Weeks, B. S., Casares, F., Cadet, P., Bougaeva, M., Brownawell, B., and Stefano, G. B. (2000). Identification of morphine in the adrenal medullary chromaffin PC-12 cell line. *Brain research. Molecular brain research*, 81(1-2) :177–80.
- [Gracheva et al., 2010] Gracheva, E. O., Maryon, E. B., Berthelot-Grosjean, M., and Richmond, J. E. (2010). Differential Regulation of Synaptic Vesicle Tethering and Docking by UNC-18 and TOM-1. *Frontiers in synaptic neuroscience*, 2 :141.
- [Grashoff et al., 2010] Grashoff, C., Hoffman, B. D., Brenner, M. D., Zhou, R., Parsons, M., Yang, M. T., McLean, M. A., Sligar, S. G., Chen, C. S., Ha, T., and Schwartz, M. A. (2010). Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature*, 466(7303) :263–6.
- [Griscelli et al., 1978] Griscelli, C., Durandy, A., Guy-Grand, D., Daguillard, F., Herzog, C., and Prunieras, M. (1978). A syndrome associating partial albinism and immunodeficiency. *The American journal of medicine*, 65(4) :691–702.
- [Gulyás-Kovács et al., 2007] Gulyás-Kovács, A., de Wit, H., Milosevic, I., Kochubey, O., Toonen, R., Klingauf, J., Verhage, M., and Sørensen, J. B. (2007). Munc18-1 : sequential interactions with the fusion machinery stimulate vesicle docking and priming. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(32) :8676–86.

- [Guo et al., 1999] Guo, W., Roth, D., Walch-Solimena, C., and Novick, P. (1999). The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *The EMBO journal*, 18(4) :1071–80.
- [Guo et al., 2001] Guo, W., Tamanoi, F., and Novick, P. (2001). Spatial regulation of the exocyst complex by Rho1 GTPase. *Nature cell biology*, 3(4) :353–60.
- [Gutiérrez and Gil, 2011] Gutiérrez, L. M. and Gil, A. (2011). Modeling F-actin cortex influence on the secretory properties of neuroendocrine cells. *Communicative & integrative biology*, 4(4) :413–5.
- [Haddad et al., 2001] Haddad, E. K., Wu, X., Hammer, J. A., and Henkart, P. A. (2001). Defective granule exocytosis in Rab27a-deficient lymphocytes from Ashen mice. *The Journal of cell biology*, 152(4) :835–42.
- [Hamm-Alvarez et al., 1997] Hamm-Alvarez, S. F., Da Costa, S., Yang, T., Wei, X., Gierow, J. P., and Mircheff, A. K. (1997). Cholinergic stimulation of lacrimal acinar cells promotes redistribution of membrane-associated kinesin and the secretory protein, beta-hexosaminidase, and increases kinesin motor activity. *Experimental eye research*, 64(2) :141–56.
- [Hammer and Sellers, 2012] Hammer, J. A. and Sellers, J. R. (2012). Walking to work : roles for class V myosins as cargo transporters. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(1) :13–26.
- [Han and Jackson, 2006] Han, X. and Jackson, M. B. (2006). Structural transitions in the synaptic SNARE complex during Ca²⁺-triggered exocytosis. *The Journal of cell biology*, 172(2) :281–93.
- [Handley et al., 2007] Handley, M. T. W., Haynes, L. P., and Burgoyne, R. D. (2007). Differential dynamics of Rab3A and Rab27A on secretory granules. *Journal of cell science*, 120(Pt 6) :973–84.
- [Hannah et al., 2003] Hannah, M. J., Hume, A. N., Arribas, M., Williams, R., Hewlett, L. J., Seabra, M. C., and Cutler, D. F. (2003). Weibel-Palade bodies recruit Rab27 by a content-driven, maturation-dependent mechanism that is independent of cell type. *Journal of cell science*, 116(Pt 19) :3939–48.

- [Harata et al., 2006] Harata, N. C., Aravanis, A. M., and Tsien, R. W. (2006). Kiss-and-run and full-collapse fusion as modes of exo-endocytosis in neurosecretion. *Journal of neurochemistry*, 97(6) :1546–70.
- [Harlow et al., 2001] Harlow, M. L., Ress, D., Stoschek, A., Marshall, R. M., and McMahan, U. J. (2001). The architecture of active zone material at the frog’s neuromuscular junction. *Nature*, 409(6819) :479–84.
- [Hartmann and Lindau, 1995] Hartmann, J. and Lindau, M. (1995). A novel $\text{Ca}(2+)$ -dependent step in exocytosis subsequent to vesicle fusion. *FEBS letters*, 363(3) :217–20.
- [Hay and Martin, 1992] Hay, J. C. and Martin, T. F. (1992). Resolution of regulated secretion into sequential MgATP-dependent and calcium-dependent stages mediated by distinct cytosolic proteins. *The Journal of cell biology*, 119(1) :139–51.
- [Hay and Martin, 1993] Hay, J. C. and Martin, T. F. (1993). Phosphatidylinositol transfer protein required for ATP-dependent priming of $\text{Ca}(2+)$ -activated secretion. *Nature*, 366(6455) :572–5.
- [Hayashi et al., 1995] Hayashi, T., Yamasaki, S., Nauenburg, S., Binz, T., and Niemann, H. (1995). Disassembly of the reconstituted synaptic vesicle membrane fusion complex in vitro. *The EMBO journal*, 14(10) :2317–25.
- [He et al., 2006] He, L., Wu, X.-S., Mohan, R., and Wu, L.-G. (2006). Two modes of fusion pore opening revealed by cell-attached recordings at a synapse. *Nature*, 444(7115) :102–5.
- [Henle, 1865] Henle, J. (1865). Ueber das Gewebe der Nebenniere und der Hypophyse. *Z. rat. Med.*, (24) :143–152.
- [Henn and De La Cruz, 2005] Henn, A. and De La Cruz, E. M. (2005). Vertebrate myosin VIIb is a high duty ratio motor adapted for generating and maintaining tension. *The Journal of biological chemistry*, 280(47) :39665–76.
- [Henry et al., 1994] Henry, J. P., Botton, D., Sagne, C., Isambert, M. F., Desnos, C., Blanchard, V., Raisman-Vozari, R., Krejci, E., Massoulie, J., and Gasnier, B. (1994). Biochemistry and molecular biology of the vesi-

- cular monoamine transporter from chromaffin granules. *The Journal of experimental biology*, 196 :251–62.
- [Hernandez et al., 2012] Hernandez, J. M., Stein, A., Behrmann, E., Riedel, D., Cypionka, A., Farsi, Z., Walla, P. J., Raunser, S., and Jahn, R. (2012). Membrane fusion intermediates via directional and full assembly of the SNARE complex. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6088) :1581–4.
- [Herrero-Turrión et al., 2008] Herrero-Turrión, M. J., Calafat, J., Janssen, H., Fukuda, M., and Mollinedo, F. (2008). Rab27a regulates exocytosis of tertiary and specific granules in human neutrophils. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(6) :3793–803.
- [Heuser and Reese, 1973] Heuser, J. E. and Reese, T. S. (1973). Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *The Journal of cell biology*, 57(2) :315–44.
- [Heuser and Reese, 1981] Heuser, J. E. and Reese, T. S. (1981). Structural changes after transmitter release at the frog neuromuscular junction. *The Journal of cell biology*, 88(3) :564–80.
- [Higaki et al., 2010] Higaki, T., Kutsuna, N., Sano, T., Kondo, N., and Hasezawa, S. (2010). Quantification and cluster analysis of actin cytoskeletal structures in plant cells : role of actin bundling in stomatal movement during diurnal cycles in Arabidopsis guard cells. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 61(1) :156–65.
- [Hinners et al., 2003] Hinners, I., Wendler, F., Fei, H., Thomas, L., Thomas, G., and Tooze, S. A. (2003). AP-1 recruitment to VAMP4 is modulated by phosphorylation-dependent binding of PACS-1. *EMBO reports*, 4(12) :1182–9.
- [Hodges et al., 2009] Hodges, A. R., Bookwalter, C. S., Krementsova, E. B., and Trybus, K. M. (2009). A nonprocessive class V myosin drives cargo processively when a kinesin- related protein is a passenger. *Current biology : CB*, 19(24) :2121–5.
- [Holzwarth and Brownfield, 1985] Holzwarth, M. A. and Brownfield, M. S. (1985). Serotonin coexists with epinephrine in rat adrenal medullary cells. *Neuroendocrinology*, 41(3) :230–6.

- [Hong, 2005] Hong, W. (2005). SNAREs and traffic. *Biochimica et biophysica acta*, 1744(3) :493–517.
- [Hsu et al., 2004] Hsu, S.-C., TerBush, D., Abraham, M., and Guo, W. (2004). The exocyst complex in polarized exocytosis. *International review of cytology*, 233 :243–65.
- [Hua and Charlton, 1999] Hua, S. Y. and Charlton, M. P. (1999). Activity-dependent changes in partial VAMP complexes during neurotransmitter release. *Nature neuroscience*, 2(12) :1078–83.
- [Huang et al., 2011] Huang, C.-C., Yang, D.-M., Lin, C.-C., and Kao, L.-S. (2011). Involvement of Rab3A in vesicle priming during exocytosis : interaction with Munc13-1 and Munc18-1. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 12(10) :1356–70.
- [Huet et al., 2012] Huet, S., Fanget, I., Jouannot, O., Meireles, P., Zeiske, T., Larochette, N., Darchen, F., and Desnos, C. (2012). Myrip couples the capture of secretory granules by the actin-rich cell cortex and their attachment to the plasma membrane. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(7) :2564–77.
- [Huet et al., 2006] Huet, S., Karatekin, E., Tran, V. S., Fanget, I., Cribier, S., and Henry, J.-P. (2006). Analysis of transient behavior in complex trajectories : application to secretory vesicle dynamics. *Biophysical journal*, 91(9) :3542–59.
- [Huh et al., 2001] Huh, G. Y., Glantz, S. B., Je, S., Morrow, J. S., and Kim, J. H. (2001). Calpain proteolysis of alpha II-spectrin in the normal adult human brain. *Neuroscience letters*, 316(1) :41–4.
- [Humeau et al., 2002] Humeau, Y., Popoff, M. R., Kojima, H., Doussau, F., and Poulain, B. (2002). Rac GTPase plays an essential role in exocytosis by controlling the fusion competence of release sites. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(18) :7968–81.
- [Humeau et al., 2001] Humeau, Y., Vitale, N., Chasserot-Golaz, S., Dupont, J. L., Du, G., Frohman, M. A., Bader, M. F., and Poulain, B. (2001). A role

- for phospholipase D1 in neurotransmitter release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(26) :15300–5.
- [Hunt et al., 1994] Hunt, J. M., Bommert, K., Charlton, M. P., Kistner, A., Habermann, E., Augustine, G. J., and Betz, H. (1994). A post-docking role for synaptobrevin in synaptic vesicle fusion. *Neuron*, 12(6) :1269–79.
- [Huntwork and Littleton, 2007] Huntwork, S. and Littleton, J. T. (2007). A complexin fusion clamp regulates spontaneous neurotransmitter release and synaptic growth. *Nature neuroscience*, 10(10) :1235–7.
- [Imai et al., 2004] Imai, A., Yoshie, S., Nashida, T., Shimomura, H., and Fukuda, M. (2004). The small GTPase Rab27B regulates amylase release from rat parotid acinar cells. *Journal of cell science*, 117(Pt 10) :1945–53.
- [Itakura et al., 1999] Itakura, M., Misawa, H., Sekiguchi, M., Takahashi, S., and Takahashi, M. (1999). Transfection analysis of functional roles of complexin I and II in the exocytosis of two different types of secretory vesicles. *Biochemical and biophysical research communications*, 265(3) :691–6.
- [Itoh et al., 2005] Itoh, T., Erdmann, K. S., Roux, A., Habermann, B., Werner, H., and De Camilli, P. (2005). Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins. *Developmental cell*, 9(6) :791–804.
- [Itoh and Fukuda, 2006] Itoh, T. and Fukuda, M. (2006). Identification of EPI64 as a GTPase-activating protein specific for Rab27A. *The Journal of biological chemistry*, 281(42) :31823–31.
- [Ivarsson et al., 2005] Ivarsson, R., Jing, X., Waselle, L., Regazzi, R., and Renström, E. (2005). Myosin 5a controls insulin granule recruitment during late-phase secretion. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 6(11) :1027–35.
- [Jackson and Chapman, 2008] Jackson, M. B. and Chapman, E. R. (2008). The fusion pores of Ca²⁺-triggered exocytosis. *Nature structural & molecular biology*, 15(7) :684–9.
- [Jahn and Grubmüller, 2002] Jahn, R. and Grubmüller, H. (2002). Membrane fusion. *Current opinion in cell biology*, 14(4) :488–95.

- [Jahn and Scheller, 2006] Jahn, R. and Scheller, R. H. (2006). SNAREs—engines for membrane fusion. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(9) :631–43.
- [James et al., 2008] James, D. J., Khodthong, C., Kowalchuk, J. A., and Martin, T. F. J. (2008). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates SNARE-dependent membrane fusion. *The Journal of cell biology*, 182(2) :355–66.
- [Jancic et al., 2007] Jancic, C., Savina, A., Wasmeier, C., Tolmachova, T., El-Benna, J., Dang, P. M.-C., Pascolo, S., Gougerot-Pocidallo, M.-A., Raposo, G., Seabra, M. C., and Amigorena, S. (2007). Rab27a regulates phagosomal pH and NADPH oxidase recruitment to dendritic cell phagosomes. *Nature cell biology*, 9(4) :367–78.
- [Jankowski et al., 1993] Jankowski, J. A., Schroeder, T. J., Ciolkowski, E. L., and Wightman, R. M. (1993). Temporal characteristics of quantal secretion of catecholamines from adrenal medullary cells. *The Journal of biological chemistry*, 268(20) :14694–700.
- [Jefferies et al., 2008] Jefferies, K. C., Cipriano, D. J., and Forgacs, M. (2008). Function, structure and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *Archives of biochemistry and biophysics*, 476(1) :33–42.
- [Johns et al., 2001] Johns, L. M., Levitan, E. S., Shelden, E. A., Holz, R. W., and Axelrod, D. (2001). Restriction of secretory granule motion near the plasma membrane of chromaffin cells. *The Journal of cell biology*, 153(1) :177–90.
- [Johnson et al., 2010] Johnson, J. L., Brzezinska, A. A., Tolmachova, T., Munafò, D. B., Ellis, B. A., Seabra, M. C., Hong, H., and Catz, S. D. (2010). Rab27a and Rab27b regulate neutrophil azurophilic granule exocytosis and NADPH oxidase activity by independent mechanisms. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 11(4) :533–47.
- [Johnson, 1988] Johnson, R. G. (1988). Accumulation of biological amines into chromaffin granules : a model for hormone and neurotransmitter transport. *Physiological reviews*, 68(1) :232–307.

- [Jorgacevski et al., 2010] Jorgacevski, J., Fosnarić, M., Vardjan, N., Stenovec, M., Potokar, M., Kreft, M., Kralj-Iglic, V., Iglic, A., and Zorec, R. (2010). Fusion pore stability of peptidergic vesicles. *Molecular membrane biology*, 27(2-3) :65–80.
- [Jun and Wickner, 2007] Jun, Y. and Wickner, W. (2007). Assays of vacuole fusion resolve the stages of docking, lipid mixing, and content mixing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(32) :13010–5.
- [Kakhlon et al., 2006] Kakhlon, O., Sakya, P., Larijani, B., Watson, R., and Tooze, S. A. (2006). GGA function is required for maturation of neuroendocrine secretory granules. *The EMBO journal*, 25(8) :1590–602.
- [Karatekin et al., 2003] Karatekin, E., Sandre, O., Guitouni, H., Borghi, N., Puech, P.-H., and Brochard-Wyart, F. (2003). Cascades of transient pores in giant vesicles : line tension and transport. *Biophysical journal*, 84(3) :1734–49.
- [Karatekin et al., 2008] Karatekin, E., Tran, V. S., Huet, S., Fanget, I., Cribier, S., and Henry, J.-P. (2008). A 20-nm step toward the cell membrane preceding exocytosis may correspond to docking of tethered granules. *Biophysical journal*, 94(7) :2891–905.
- [Kasai et al., 2005] Kasai, K., Ohara-Imaizumi, M., Takahashi, N., Mizutani, S., Zhao, S., Kikuta, T., Kasai, H., Nagamatsu, S., Gomi, H., and Izumi, T. (2005). Rab27a mediates the tight docking of insulin granules onto the plasma membrane during glucose stimulation. *The Journal of clinical investigation*, 115(2) :388–96.
- [Katsov et al., 2004] Katsov, K., Müller, M., and Schick, M. (2004). Field theoretic study of bilayer membrane fusion. I. Hemifusion mechanism. *Biophysical journal*, 87(5) :3277–90.
- [Katsumata et al., 2007] Katsumata, O., Fujita-Yoshigaki, J., Hara-Yokoyama, M., Yanagishita, M., Furuyama, S., and Sugiya, H. (2007). Syntaxin6 separates from GM1a-rich membrane microdomain during granule maturation. *Biochemical and biophysical research communications*, 357(4) :1071–7.

- [Kim et al., 2001] Kim, T., Tao-Cheng, J. H., Eiden, L. E., and Loh, Y. P. (2001). Chromogranin A, an "on/off" switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. *Cell*, 106(4) :499–509.
- [Kiss et al., 1990] Kiss, J. Z., Giddings, T. H., Staehelin, L. A., and Sack, F. D. (1990). Comparison of the ultrastructure of conventionally fixed and high pressure frozen/freeze substituted root tips of *Nicotiana* and *Arabidopsis*. *Protoplasma*, 157 :64–74.
- [Kiyonaka et al., 2007] Kiyonaka, S., Wakamori, M., Miki, T., Uriu, Y., Nonaka, M., Bito, H., Beedle, A. M., Mori, E., Hara, Y., De Waard, M., Kanagawa, M., Itakura, M., Takahashi, M., Campbell, K. P., and Mori, Y. (2007). RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca²⁺ channels. *Nature neuroscience*, 10(6) :691–701.
- [Klumperman et al., 1998] Klumperman, J., Kuliawat, R., Griffith, J. M., Geuze, H. J., and Arvan, P. (1998). Mannose 6-phosphate receptors are sorted from immature secretory granules via adaptor protein AP-1, clathrin, and syntaxin 6-positive vesicles. *The Journal of cell biology*, 141(2) :359–71.
- [Klyachko and Jackson, 2002] Klyachko, V. A. and Jackson, M. B. (2002). Capacitance steps and fusion pores of small and large-dense-core vesicles in nerve terminals. *Nature*, 418(6893) :89–92.
- [Knecht and Grubmüller, 2003] Knecht, V. and Grubmüller, H. (2003). Mechanical coupling via the membrane fusion SNARE protein syntaxin 1A : a molecular dynamics study. *Biophysical journal*, 84(3) :1527–47.
- [Kögel and Gerdes, 2010] Kögel, T. and Gerdes, H.-H. (2010). Maturation of secretory granules. *Results and problems in cell differentiation*, 50 :1–20.
- [Kögel et al., 2010] Kögel, T., Rudolf, R., Hodneland, E., Hellwig, A., Kuznetsov, S. A., Seiler, F., Söllner, T. H., Barroso, J. a., and Gerdes, H.-H. (2010). Distinct roles of myosin Va in membrane remodeling and exocytosis of secretory granules. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 11(5) :637–50.

- [Koh and Bellen, 2003] Koh, T. W. and Bellen, H. J. (2003). Synaptotagmin I, a Ca^{2+} sensor for neurotransmitter release. *Trends in neurosciences*, 26(8) :413–22.
- [Kohn, 1900] Kohn, A. (1900). Ueber den Bau und die Entwicklung der sog. Carotisdrüse. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, 56(1) :81–148.
- [Kohn, 1903] Kohn, A. (1903). Die Paraganglien. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, 62(1) :263–365.
- [Kohn, 1902] Kohn, G. P. (1902). Das chromaffine Gewebe. *Z. ges. Anat. 3. Ergebn. Anat. EntwGesch.*, 12 :253–348.
- [Kondo et al., 2006] Kondo, H., Shirakawa, R., Higashi, T., Kawato, M., Fukuda, M., Kita, T., and Horiuchi, H. (2006). Constitutive GDP/GTP exchange and secretion-dependent GTP hydrolysis activity for Rab27 in platelets. *The Journal of biological chemistry*, 281(39) :28657–65.
- [Korteweg et al., 2005] Korteweg, N., Maia, A. S., Thompson, B., Roubos, E. W., Burbach, J. P. H., and Verhage, M. (2005). The role of Munc18-1 in docking and exocytosis of peptide hormone vesicles in the anterior pituitary. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 97(6) :445–55.
- [Kozlov et al., 1989] Kozlov, M. M., Leikin, S. L., Chernomordik, L. V., Markin, V. S., and Chizmadzhev, Y. A. (1989). Stalk mechanism of vesicle fusion. Intermixing of aqueous contents. *European biophysics journal : EBJ*, 17(3) :121–9.
- [Krobath et al., 2011] Krobath, H., Rózycki, B., Lipowsky, R., and Weikl, T. R. (2011). Line tension and stability of domains in cell-adhesion zones mediated by long and short receptor-ligand complexes. *PloS one*, 6(8) :e23284.
- [Krömer et al., 1998] Krömer, A., Glombik, M. M., Huttner, W. B., and Gerdes, H. H. (1998). Essential role of the disulfide-bonded loop of chromogranin B for sorting to secretory granules is revealed by expression of a deletion mutant in the absence of endogenous granin synthesis. *The Journal of cell biology*, 140(6) :1331–46.

- [Kryvi et al., 1979] Kryvi, H., Flatmark, T., and Terland, O. (1979). Comparison of the ultrastructure of adrenaline and noradrenaline storage granules of bovine adrenal medulla. *European journal of cell biology*, 20(1) :76–82.
- [Kümmel et al., 2011] Kümmel, D., Krishnakumar, S. S., Radoff, D. T., Li, F., Giraudo, C. G., Pincet, F., Rothman, J. E., and Reinisch, K. M. (2011). Complexin cross-links prefusion SNAREs into a zigzag array. *Nature structural & molecular biology*, 18(8) :927–33.
- [Kurien and Scofield, 2006] Kurien, B. T. and Scofield, R. H. (2006). Western blotting. *Methods (San Diego, Calif.)*, 38(4) :283–93.
- [Kuroda and Fukuda, 2005] Kuroda, T. S. and Fukuda, M. (2005). Identification and biochemical analysis of Slac2-c/MyRIP as a Rab27A-, myosin Va/VIIa-, and actin-binding protein. *Methods in enzymology*, 403 :431–44.
- [Lang et al., 2000] Lang, T., Wacker, I., Wunderlich, I., Rohrbach, A., Giese, G., Soldati, T., and Almers, W. (2000). Role of actin cortex in the subplasmalemmal transport of secretory granules in PC-12 cells. *Biophysical journal*, 78(6) :2863–77.
- [Lee and Lentz, 1997] Lee, J. and Lentz, B. R. (1997). Evolution of lipidic structures during model membrane fusion and the relation of this process to cell membrane fusion. *Biochemistry*, 36(21) :6251–9.
- [Li et al., 2011] Li, F., Pincet, F., Perez, E., Giraudo, C. G., Taresté, D., and Rothman, J. E. (2011). Complexin activates and clamps SNAREpins by a common mechanism involving an intermediate energetic state. *Nature structural & molecular biology*, 18(8) :941–6.
- [Lindau and Almers, 1995] Lindau, M. and Almers, W. (1995). Structure and function of fusion pores in exocytosis and ectoplasmic membrane fusion. *Current opinion in cell biology*, 7(4) :509–17.
- [Lindsay and McCaffrey, 2011] Lindsay, A. J. and McCaffrey, M. W. (2011). Myosin Va is required for P body but not stress granule formation. *The Journal of biological chemistry*, 286(13) :11519–28.
- [Liu et al., 2008] Liu, T., Wang, T., Chapman, E. R., and Weisshaar, J. C. (2008). Productive hemifusion intermediates in fast vesicle fusion driven by neuronal SNAREs. *Biophysical journal*, 94(4) :1303–14.

- [Liu et al., 2012] Liu, Y., Belkina, N. V., Park, C., Nambiar, R., Loughhead, S. M., Patino-Lopez, G., Ben-Aissa, K., Hao, J.-J., Kruhlak, M. J., Qi, H., von Andrian, U. H., Kehrl, J. H., Tyska, M. J., and Shaw, S. (2012). Constitutively active ezrin increases membrane tension, slows migration, and impedes endothelial transmigration of lymphocytes in vivo in mice. *Blood*, 119(2) :445–53.
- [Liu et al., 2010] Liu, Y., Schirra, C., Edelmann, L., Matti, U., Rhee, J., Hof, D., Bruns, D., Brose, N., Rieger, H., Stevens, D. R., and Rettig, J. (2010). Two distinct secretory vesicle-priming steps in adrenal chromaffin cells. *The Journal of cell biology*, 190(6) :1067–77.
- [Lollike et al., 1995] Lollike, K., Borregaard, N., and Lindau, M. (1995). The exocytotic fusion pore of small granules has a conductance similar to an ion channel. *The Journal of cell biology*, 129(1) :99–104.
- [Lollike et al., 1998] Lollike, K., Borregaard, N., and Lindau, M. (1998). Capacitance flickers and pseudoflickers of small granules, measured in the cell-attached configuration. *Biophysical journal*, 75(1) :53–9.
- [Lou et al., 2007] Lou, H., Smith, A. M., Coates, L. C., Cawley, N. X., Loh, Y. P., and Birch, N. P. (2007). The transmembrane domain of the prohormone convertase PC3 : a key motif for targeting to the regulated secretory pathway. *Molecular and cellular endocrinology*, 267(1-2) :17–25.
- [Lupas et al., 1991] Lupas, A., Van Dyke, M., and Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science (New York, N.Y.)*, 252(5010) :1162–4.
- [Malacombe et al., 2006a] Malacombe, M., Bader, M.-F., and Gasman, S. (2006a). Exocytosis in neuroendocrine cells : new tasks for actin. *Biochimica et biophysica acta*, 1763(11) :1175–83.
- [Malacombe et al., 2006b] Malacombe, M., Ceridono, M., Calco, V., Chasserot-Golaz, S., McPherson, P. S., Bader, M.-F., and Gasman, S. (2006b). Intersectin-1L nucleotide exchange factor regulates secretory granule exocytosis by activating Cdc42. *The EMBO journal*, 25(15) :3494–503.

- [Malsam et al., 2008] Malsam, J., Kreye, S., and Söllner, T. H. (2008). Membrane fusion : SNAREs and regulation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65(18) :2814–32.
- [Malsam et al., 2012] Malsam, J., Parisotto, D., Bharat, T. A. M., Scheut-zow, A., Krause, J. M., Briggs, J. A. G., and Söllner, T. H. (2012). Complexin arrests a pool of docked vesicles for fast Ca(2+)-dependent release. *The EMBO journal*.
- [Marcu et al., 1996] Marcu, M. G., Zhang, L., Nau-Staudt, K., and Trifaró, J. M. (1996). Recombinant scinderin, an F-actin severing protein, increases calcium-induced release of serotonin from permeabilized platelets, an effect blocked by two scinderin-derived actin-binding peptides and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Blood*, 87(1) :20–4.
- [Margittai et al., 2003] Margittai, M., Widengren, J., Schweinberger, E., Schröder, G. F., Felekyan, S., Haustein, E., König, M., Fasshauer, D., Grubmüller, H., Jahn, R., and Seidel, C. A. M. (2003). Single-molecule fluorescence resonance energy transfer reveals a dynamic equilibrium between closed and open conformations of syntaxin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26) :15516–21.
- [Martelli et al., 2000] Martelli, A. M., Baldini, G., Tabellini, G., Koticha, D., and Bareggi, R. (2000). Rab3A and Rab3D control the total granule number and the fraction of granules docked at the plasma membrane in PC12 cells. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 1(12) :976–86.
- [Martens et al., 2007] Martens, S., Kozlov, M. M., and McMahon, H. T. (2007). How synaptotagmin promotes membrane fusion. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5828) :1205–8.
- [Martinez-Arca et al., 2000] Martinez-Arca, S., Alberts, P., Zahraoui, A., Louvard, D., and Galli, T. (2000). Role of tetanus neurotoxin insensitive vesicle-associated membrane protein (TI-VAMP) in vesicular transport mediating neurite outgrowth. *The Journal of cell biology*, 149(4) :889–900.

- [Masedunskas et al., 2012] Masedunskas, A., Porat-Shliom, N., and Weigert, R. (2012). Linking differences in membrane tension with the requirement for a contractile actomyosin scaffold during exocytosis in salivary glands. *Communicative & integrative biology*, 5(1) :84–7.
- [Masedunskas et al., 2011] Masedunskas, A., Sramkova, M., Parente, L., Sales, K. U., Amornphimoltham, P., Bugge, T. H., and Weigert, R. (2011). Role for the actomyosin complex in regulated exocytosis revealed by intravital microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(33) :13552–7.
- [McConnell and Tyska, 2010] McConnell, R. E. and Tyska, M. J. (2010). Leveraging the membrane - cytoskeleton interface with myosin-1. *Trends in cell biology*, 20(7) :418–26.
- [McEwen et al., 2006] McEwen, J. M., Madison, J. M., Dybbs, M., and Kaplan, J. M. (2006). Antagonistic regulation of synaptic vesicle priming by Tomosyn and UNC-13. *Neuron*, 51(3) :303–15.
- [McMahon et al., 1995] McMahon, H. T., Missler, M., Li, C., and Südhof, T. C. (1995). Complexins : cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function. *Cell*, 83(1) :111–9.
- [Mehta et al., 1999] Mehta, A. D., Rock, R. S., Rief, M., Spudich, J. A., Mooseker, M. S., and Cheney, R. E. (1999). Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature*, 400(6744) :590–3.
- [Ménasché et al., 2000] Ménasché, G., Pastural, E., Feldmann, J., Certain, S., Ersoy, F., Dupuis, S., Wulffraat, N., Bianchi, D., Fischer, A., Le Deist, F., and de Saint Basile, G. (2000). Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nature genetics*, 25(2) :173–6.
- [Meng and Sachs, 2011] Meng, F. and Sachs, F. (2011). Visualizing dynamic cytoplasmic forces with a compliance-matched FRET sensor. *Journal of cell science*, 124(Pt 2) :261–9.
- [Merrins and Stuenkel, 2008] Merrins, M. J. and Stuenkel, E. L. (2008). Kinetics of Rab27a-dependent actions on vesicle docking and priming in pancreatic beta-cells. *The Journal of physiology*, 586(Pt 22) :5367–81.

- [Miesenböck et al., 1998] Miesenböck, G., De Angelis, D. A., and Rothman, J. E. (1998). Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*, 394(6689) :192–5.
- [Milosevic et al., 2005] Milosevic, I., Sørensen, J. B., Lang, T., Krauss, M., Nagy, G., Haucke, V., Jahn, R., and Neher, E. (2005). Plasmalemmal phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate level regulates the releasable vesicle pool size in chromaffin cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(10) :2557–65.
- [Mitchison T, 1984] Mitchison T, K. M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*.
- [Mizuno-Kamiya et al., 2001] Mizuno-Kamiya, M., Inokuchi, H., Kameyama, Y., Yashiro, K., and Fujita, A. (2001). Ca²⁺-independent phospholipase A2 activity in apical plasma membranes from the rat parotid gland. *Archives of oral biology*, 46(9) :789–99.
- [Molinete et al., 2000] Molinete, M., Irminger, J. C., Tooze, S. A., and Halban, P. A. (2000). Trafficking/sorting and granule biogenesis in the beta-cell. *Seminars in cell & developmental biology*, 11(4) :243–51.
- [Monck et al., 1990] Monck, J. R., Alvarez de Toledo, G., and Fernandez, J. M. (1990). Tension in secretory granule membranes causes extensive membrane transfer through the exocytotic fusion pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(20) :7804–8.
- [Montero et al., 2002] Montero, M., Alonso, M. T., Albillos, A., Cuchillo-Ibáñez, I., Olivares, R., Villalobos, C., and Alvarez, J. (2002). Effect of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor stimulation on mitochondrial [Ca²⁺] and secretion in chromaffin cells. *The Biochemical journal*, 365(Pt 2) :451–9.
- [Montero-Hadjadje et al., 2009] Montero-Hadjadje, M., Elias, S., Chevalier, L., Benard, M., Tanguy, Y., Turquier, V., Galas, L., Yon, L., Malagon, M. M., Driouich, A., Gasman, S., and Anouar, Y. (2009). 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(18) :12420–31.
- [Moore et al., 2007] Moore, B. A., Robinson, H. H., and Xu, Z. (2007). The crystal structure of mouse Exo70 reveals unique features of the mammalian exocyst. *Journal of molecular biology*, 371(2) :410–21.
- [Moore et al., 1983] Moore, H. P., Gumbiner, B., and Kelly, R. B. (1983). Chloroquine diverts ACTH from a regulated to a constitutive secretory pathway in AtT-20 cells. *Nature*, 302(5907) :434–6.
- [Morel et al., 2003] Morel, N., Dedieu, J.-C., and Philippe, J.-M. (2003). Specific sorting of the $\alpha 1$ isoform of the V-H+ATPase a subunit to nerve terminals where it associates with both synaptic vesicles and the presynaptic plasma membrane. *Journal of cell science*, 116(Pt 23) :4751–62.
- [Moser and Neher, 1997] Moser, T. and Neher, E. (1997). Rapid exocytosis in single chromaffin cells recorded from mouse adrenal slices. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(7) :2314–23.
- [Moskalenko et al., 2002] Moskalenko, S., Henry, D. O., Rosse, C., Mirey, G., Camonis, J. H., and White, M. A. (2002). The exocyst is a Ral effector complex. *Nature cell biology*, 4(1) :66–72.
- [Mouchantaf et al., 2001] Mouchantaf, R., Kumar, U., Sulea, T., and Patel, Y. C. (2001). A conserved alpha-helix at the amino terminus of prosomatostatin serves as a sorting signal for the regulated secretory pathway. *The Journal of biological chemistry*, 276(28) :26308–16.
- [Mullins, 2000] Mullins, R. D. (2000). How WASP-family proteins and the Arp2/3 complex convert intracellular signals into cytoskeletal structures. *Current opinion in cell biology*, 12(1) :91–6.
- [Munafó et al., 2007] Munafó, D. B., Johnson, J. L., Ellis, B. A., Rutschmann, S., Beutler, B., and Catz, S. D. (2007). Rab27a is a key component of the secretory machinery of azurophilic granules in granulocytes. *The Biochemical journal*, 402(2) :229–39.

- [Murakoshi et al., 2011] Murakoshi, H., Wang, H., and Yasuda, R. (2011). Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines. *Nature*, 472(7341) :100–4.
- [Nakata, 1992] Nakata, T. (1992). Cytoskeleton of cultured chromaffin cells and involvement in secretion as revealed by quick-freeze, deep-etching, and double-label immunoelectron microscopy. *The Journal of neuroscience*, 12(6)(June) :2186–2197.
- [Nalbant et al., 2004] Nalbant, P., Hodgson, L., Kraynov, V., Touthkine, A., and Hahn, K. (2004). Activation of endogenous Cdc42 visualized in living cells. *Science*, 305(5690) :1615.
- [Nambiar et al., 2009] Nambiar, R., McConnell, R. E., and Tyska, M. J. (2009). Control of cell membrane tension by myosin-I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(29) :11972–7.
- [Natori and Huttner, 1996] Natori, S. and Huttner, W. B. (1996). Chromogranin B (secretogranin I) promotes sorting to the regulated secretory pathway of processing intermediates derived from a peptide hormone precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(9) :4431–6.
- [Neco et al., 2008] Neco, P., Fernández-Peruchena, C., Navas, S., Gutiérrez, L. M., de Toledo, G. A., and Alés, E. (2008). Myosin II contributes to fusion pore expansion during exocytosis. *The Journal of biological chemistry*, 283(16) :10949–57.
- [Nevins and Thurmond, 2003] Nevins, A. K. and Thurmond, D. C. (2003). Glucose regulates the cortical actin network through modulation of Cdc42 cycling to stimulate insulin secretion. *American journal of physiology. Cell physiology*, 285(3) :C698–710.
- [Nguyen et al., 1995] Nguyen, D. N., Becker, G. W., and Riggan, R. M. (1995). Protein mass spectrometry : applications to analytical biotechnology. *Journal of chromatography. A*, 705(1) :21–45.
- [Nicholson et al., 1998] Nicholson, K. L., Munson, M., Miller, R. B., Filip, T. J., Fairman, R., and Hughson, F. M. (1998). Regulation of SNARE

- complex assembly by an N-terminal domain of the t-SNARE Sso1p. *Nature structural biology*, 5(9) :793–802.
- [Nofal et al., 2007] Nofal, S., Becherer, U., Hof, D., Matti, U., and Rettig, J. (2007). Primed vesicles can be distinguished from docked vesicles by analyzing their mobility. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(6) :1386–95.
- [Nonet et al., 1997] Nonet, M. L., Staunton, J. E., Kilgard, M. P., Fergestad, T., Hartweg, E., Horvitz, H. R., Jorgensen, E. M., and Meyer, B. J. (1997). *Caenorhabditis elegans* rab-3 mutant synapses exhibit impaired function and are partially depleted of vesicles. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(21) :8061–73.
- [Novick et al., 1980] Novick, P., Field, C., and Schekman, R. (1980). Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell*, 21(1) :205–15.
- [Novick and Guo, 2002] Novick, P. and Guo, W. (2002). Ras family therapy : Rab, Rho and Ral talk to the exocyst. *Trends in cell biology*, 12(6) :247–9.
- [Novick and Schekman, 1979] Novick, P. and Schekman, R. (1979). Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(4) :1858–62.
- [Obermüller et al., 2005] Obermüller, S., Lindqvist, A., Karanauskaite, J., Galvanovskis, J., Rorsman, P., and Barg, S. (2005). Selective nucleotide-release from dense-core granules in insulin-secreting cells. *Journal of cell science*, 118(Pt 18) :4271–82.
- [O'Connor et al., 1997] O'Connor, V., Heuss, C., De Bello, W. M., Dresbach, T., Charlton, M. P., Hunt, J. H., Pellegrini, L. L., Hodel, A., Burger, M. M., Betz, H., Augustine, G. J., and Schäfer, T. (1997). Disruption of syntaxin-mediated protein interactions blocks neurotransmitter secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(22) :12186–91.
- [Oheim et al., 1999] Oheim, M., Loerke, D., Stühmer, W., and Chow, R. H. (1999). Multiple stimulation-dependent processes regulate the size of the

- releasable pool of vesicles. *European biophysics journal : EBJ*, 28(2) :91–101.
- [Oheim and Stühmer, 2000] Oheim, M. and Stühmer, W. (2000). Tracking chromaffin granules on their way through the actin cortex. *European biophysics journal : EBJ*, 29(2) :67–89.
- [Omiatek et al., 2010] Omiatek, D. M., Cans, A.-S., Heien, M. L., and Ewing, A. G. (2010). Analytical approaches to investigate transmitter content and release from single secretory vesicles. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397(8) :3269–79.
- [Ono et al., 1998] Ono, S., Baux, G., Sekiguchi, M., Fossier, P., Morel, N. F., Nihonmatsu, I., Hirata, K., Awaji, T., Takahashi, S., and Takahashi, M. (1998). Regulatory roles of complexins in neurotransmitter release from mature presynaptic nerve terminals. *The European journal of neuroscience*, 10(6) :2143–52.
- [Orci et al., 1972] Orci, L., Gabbay, K. H., and Malaisse, W. J. (1972). Pancreatic beta-cell web : its possible role in insulin secretion. *Science (New York, N.Y.)*, 175(4026) :1128–30.
- [Ostermeier and Brunger, 1999] Ostermeier, C. and Brunger, A. T. (1999). Structural basis of Rab effector specificity : crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of rabphilin-3A. *Cell*, 96(3) :363–74.
- [Ostrowski et al., 2010] Ostrowski, M., Carmo, N. B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C. F., Schauer, K., Hume, A. N., Freitas, R. P., Goud, B., Benaroch, P., Hacohen, N., Fukuda, M., Desnos, C., Seabra, M. C., Darchen, F., Amigorena, S., Moita, L. F., and Thery, C. (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature cell biology*, 12(1) :19–30 ; sup pp 1–13.
- [Pabst et al., 2000] Pabst, S., Hazzard, J. W., Antonin, W., Südhof, T. C., Jahn, R., Rizo, J., and Fasshauer, D. (2000). Selective interaction of complexin with the neuronal SNARE complex. Determination of the binding regions. *The Journal of biological chemistry*, 275(26) :19808–18.

- [Pabst et al., 2002] Pabst, S., Margittai, M., Vainius, D., Langen, R., Jahn, R., and Fasshauer, D. (2002). Rapid and selective binding to the synaptic SNARE complex suggests a modulatory role of complexins in neuroexocytosis. *The Journal of biological chemistry*, 277(10) :7838–48.
- [Pan et al., 2009] Pan, P.-Y., Tian, J.-H., and Sheng, Z.-H. (2009). Snapin facilitates the synchronization of synaptic vesicle fusion. *Neuron*, 61(3) :412–24.
- [Parekh et al., 1994] Parekh, D., Ishizuka, J., Townsend, C. M., Haber, B., Beauchamp, R. D., Karp, G., Kim, S. W., Rajaraman, S., Greeley, G., and Thompson, J. C. (1994). Characterization of a human pancreatic carcinoid in vitro : morphology, amine and peptide storage, and secretion. *Pancreas*, 9(1) :83–90.
- [Park et al., 2008] Park, J. J., Koshimizu, H., and Loh, Y. P. (2008). Biogenesis and transport of secretory granules to release site in neuroendocrine cells. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 37(2) :151–9.
- [Parlati et al., 1999] Parlati, F., Weber, T., McNew, J. A., Westermann, B., Söllner, T. H., and Rothman, J. E. (1999). Rapid and efficient fusion of phospholipid vesicles by the alpha-helical core of a SNARE complex in the absence of an N-terminal regulatory domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(22) :12565–70.
- [Parsons et al., 2010] Parsons, J. T., Horwitz, A. R., and Schwartz, M. A. (2010). Cell adhesion : integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(9) :633–43.
- [Patzak and Winkler, 1986] Patzak, A. and Winkler, H. (1986). Exocytotic exposure and recycling of membrane antigens of chromaffin granules : ultrastructural evaluation after immunolabeling. *The Journal of cell biology*, 102(2) :510–5.
- [Pavlos et al., 2010] Pavlos, N. J., Grønborg, M., Riedel, D., Chua, J. J. E., Boyken, J., Kloepper, T. H., Urlaub, H., Rizzoli, S. O., and Jahn, R. (2010). Quantitative analysis of synaptic vesicle Rabs uncovers distinct yet overlapping roles for Rab3a and Rab27b in Ca²⁺-triggered exocyto-

- sis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(40) :13441–53.
- [Pendleton and Koffer, 2001] Pendleton, A. and Koffer, A. (2001). Effects of latrunculin reveal requirements for the actin cytoskeleton during secretion from mast cells. *Cell motility and the cytoskeleton*, 48(1) :37–51.
- [Perrais et al., 2004] Perrais, D., Kleppe, I. C., Taraska, J. W., and Almers, W. (2004). Recapture after exocytosis causes differential retention of protein in granules of bovine chromaffin cells. *The Journal of physiology*, 560(Pt 2) :413–28.
- [Perrin and Aunis, 1985] Perrin, D. and Aunis, D. (1985). Reorganization of alpha-fodrin induced by stimulation in secretory cells. *Nature*, 315(6020) :589–92.
- [Perrin et al., 1987] Perrin, D., Langley, O. K., and Aunis, D. (1987). Anti-alpha-fodrin inhibits secretion from permeabilized chromaffin cells. *Nature*, 326(6112) :498–501.
- [Perutková et al., 2010] Perutková, S., Kralj-Iglic, V., Frank, M., and Iglic, A. (2010). Mechanical stability of membrane nanotubular protrusions influenced by attachment of flexible rod-like proteins. *Journal of biomechanics*, 43(8) :1612–7.
- [Peters et al., 2001] Peters, C., Bayer, M. J., Bühler, S., Andersen, J. S., Mann, M., and Mayer, A. (2001). Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature*, 409(6820) :581–8.
- [Pfeffer, 2003] Pfeffer, S. (2003). Membrane domains in the secretory and endocytic pathways. *Cell*, 112(4) :507–17.
- [Picard et al., 2009] Picard, M., Petrie, R. J., Antoine-Bertrand, J., Saint-Cyr-Proulx, E., Villemure, J.-F., and Lamarche-Vane, N. (2009). Spatial and temporal activation of the small GTPases RhoA and Rac1 by the netrin-1 receptor UNC5a during neurite outgrowth. *Cellular signalling*, 21(12) :1961–73.
- [Polzin et al., 2002] Polzin, A., Shipitsin, M., Goi, T., Feig, L. A., and Turner, T. J. (2002). Ral-GTPase influences the regulation of the readily relea-

- sable pool of synaptic vesicles. *Molecular and cellular biology*, 22(6) :1714–22.
- [Popii and Baumann, 2004] Popii, V. and Baumann, G. (2004). Laboratory measurement of growth hormone. *Clinica chimica acta ; international journal of clinical chemistry*, 350(1-2) :1–16.
- [Prekeris et al., 2000] Prekeris, R., Klumperman, J., and Scheller, R. H. (2000). Syntaxin 11 is an atypical SNARE abundant in the immune system. *European Journal of Cell Biology*, 79(11) :771–780.
- [Przywara et al., 1993] Przywara, D. A., Chowdhury, P. S., Bhave, S. V., Wakade, T. D., and Wakade, A. R. (1993). Barium-induced exocytosis is due to internal calcium release and block of calcium efflux. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(2) :557–61.
- [Racine et al., 2006] Racine, V., Hertzog, A., Jouanneau, J., Salamero, J., Kervrann, C., and Sibarita, J.-B. (2006). Multiple-target tracking of 3D fluorescent objects based on simulated annealing. In *Biomedical Imaging : Nano to Macro, 2006. 3rd IEEE International Symposium on*, pages 1020 – 1023, Arlington, VA.
- [Radhakrishnan et al., 2009] Radhakrishnan, A., Stein, A., Jahn, R., and Fasshauer, D. (2009). The Ca²⁺ affinity of synaptotagmin 1 is markedly increased by a specific interaction of its C2B domain with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *The Journal of biological chemistry*, 284(38) :25749–60.
- [Rahamimoff and Fernandez, 1997] Rahamimoff, R. and Fernandez, J. M. (1997). Pre- and postfusion regulation of transmitter release. *Neuron*, 18(1) :17–27.
- [Raucher and Sheetz, 1999] Raucher, D. and Sheetz, M. P. (1999). Characteristics of a membrane reservoir buffering membrane tension. *Biophysical journal*, 77(4) :1992–2002.
- [Raucher et al., 2000] Raucher, D., Stauffer, T., Chen, W., Shen, K., Guo, S., York, J. D., Sheetz, M. P., and Meyer, T. (2000). Phosphatidylinositol 4,5-

- bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion. *Cell*, 100(2) :221–8.
- [Reese et al., 2005] Reese, C., Heise, F., and Mayer, A. (2005). Trans-SNARE pairing can precede a hemifusion intermediate in intracellular membrane fusion. *Nature*, 436(7049) :410–4.
- [Reese and Mayer, 2005] Reese, C. and Mayer, A. (2005). Transition from hemifusion to pore opening is rate limiting for vacuole membrane fusion. *The Journal of cell biology*, 171(6) :981–90.
- [Reichl et al., 2008] Reichl, E. M., Ren, Y., Morpew, M. K., Delannoy, M., Effler, J. C., Girard, K. D., Divi, S., Iglesias, P. A., Kuo, S. C., and Robinson, D. N. (2008). Interactions between myosin and actin crosslinkers control cytokinesis contractility dynamics and mechanics. *Current biology : CB*, 18(7) :471–80.
- [Reim et al., 2001] Reim, K., Mansour, M., Varoqueaux, F., McMahon, H. T., Südhof, T. C., Brose, N., and Rosenmund, C. (2001). Complexins regulate a late step in Ca²⁺-dependent neurotransmitter release. *Cell*, 104(1) :71–81.
- [Rickman et al., 2006] Rickman, C., Jiménez, J. L., Graham, M. E., Archer, D. A., Soloviev, M., Burgoyne, R. D., and Davletov, B. (2006). Conserved pre-fusion protein assembly in regulated exocytosis. *Molecular biology of the cell*, 17(1) :283–94.
- [Rickman et al., 2007] Rickman, C., Medine, C. N., Bergmann, A., and Duncan, R. R. (2007). Functionally and spatially distinct modes of munc18-syntaxin 1 interaction. *The Journal of biological chemistry*, 282(16) :12097–103.
- [Ridley, 2001] Ridley, A. J. (2001). Rho proteins : linking signaling with membrane trafficking. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 2(5) :303–10.
- [Riedl et al., 2008] Riedl, J., Crevenna, A. H., Kessenbrock, K., Yu, J. H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T. A., Werb, Z., Sixt, M., and Wedlich-Soldner, R. (2008). Lifeact : a versatile marker to visualize F-actin. *Nature methods*, 5(7) :605–7.

- [Rindler, 1998] Rindler, M. J. (1998). Carboxypeptidase E, a peripheral membrane protein implicated in the targeting of hormones to secretory granules, co-aggregates with granule content proteins at acidic pH. *The Journal of biological chemistry*, 273(47) :31180–5.
- [Rizzoli and Betz, 2004] Rizzoli, S. O. and Betz, W. J. (2004). The structural organization of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5666) :2037–9.
- [Rizzoli and Jahn, 2007] Rizzoli, S. O. and Jahn, R. (2007). Kiss-and-run, collapse and 'readily retrievable' vesicles. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 8(9) :1137–44.
- [Robinson et al., 1999] Robinson, N. G., Guo, L., Imai, J., Toh-E, A., Matsui, Y., and Tamanoi, F. (1999). Rho3 of *Saccharomyces cerevisiae*, which regulates the actin cytoskeleton and exocytosis, is a GTPase which interacts with Myo2 and Exo70. *Molecular and cellular biology*, 19(5) :3580–7.
- [Rojo Pulido et al., 2011] Rojo Pulido, I., Nightingale, T. D., Darchen, F., Seabra, M. C., Cutler, D. F., and Gerke, V. (2011). Myosin Va acts in concert with Rab27a and MyRIP to regulate acute von-Willebrand factor release from endothelial cells. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 12(10) :1371–82.
- [Rosé et al., 2003] Rosé, S. D., Lejen, T., Casaletti, L., Larson, R. E., Pene, T. D., and Trifaró, J.-M. (2003). Myosins II and V in chromaffin cells : myosin V is a chromaffin vesicle molecular motor involved in secretion. *Journal of neurochemistry*, 85(2) :287–98.
- [Rothman and Warren, 1994] Rothman, J. E. and Warren, G. (1994). Implications of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics. *Current biology : CB*, 4(3) :220–33.
- [Rudolf et al., 2003] Rudolf, R., Kögel, T., Kuznetsov, S. A., Salm, T., Schlicker, O., Hellwig, A., Hammer, J. A., and Gerdes, H.-H. (2003). Myosin Va facilitates the distribution of secretory granules in the F-actin rich cortex of PC12 cells. *Journal of cell science*, 116(Pt 7) :1339–48.
- [Rudolf et al., 2001] Rudolf, R., Salm, T., Rustom, A., and Gerdes, H.-H. (2001). Dynamics of Immature Secretory Granules : Role of Cytoskeletal

- Elements during Transport, Cortical Restriction, and F-Actin-dependent Tethering. *Molecular biology of the cell*, 12(5) :1353–1365.
- [Russell et al., 2004] Russell, D., Andrews, P. D., James, J., and Lane, E. B. (2004). Mechanical stress induces profound remodelling of keratin filaments and cell junctions in epidermolysis bullosa simplex keratinocytes. *Journal of cell science*, 117(Pt 22) :5233–43.
- [Ryan, 2003] Ryan, T. A. (2003). Kiss-and-run, fuse-pinch-and-linger, fuse-and-collapse : the life and times of a neurosecretory granule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5) :2171–3.
- [Sakaba and Neher, 2001] Sakaba, T. and Neher, E. (2001). Quantitative relationship between transmitter release and calcium current at the calyx of held synapse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(2) :462–76.
- [Sakisaka et al., 2002] Sakisaka, T., Meerlo, T., Matteson, J., Plutner, H., and Balch, W. E. (2002). Rab-alphaGDI activity is regulated by a Hsp90 chaperone complex. *The EMBO journal*, 21(22) :6125–35.
- [Sankaranarayanan et al., 2003] Sankaranarayanan, S., Atluri, P. P., and Ryan, T. A. (2003). Actin has a molecular scaffolding, not propulsive, role in presynaptic function. *Nature neuroscience*, 6(2) :127–35.
- [Sassa et al., 1999] Sassa, T., Harada, S., Ogawa, H., Rand, J. B., Maruyama, I. N., and Hosono, R. (1999). Regulation of the UNC-18-Caenorhabditis elegans syntaxin complex by UNC-13. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(12) :4772–7.
- [Sato et al., 2012] Sato, M., Kitaguchi, T., Numano, R., Ikematsu, K., Kakeyama, M., Murata, M., Sato, K., and Tsuboi, T. (2012). The small GTPase Cdc42 modulates the number of exocytosis-competent dense-core vesicles in PC12 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 420(2) :417–21.
- [Schaub et al., 2007] Schaub, S., Meister, J.-J., and Verkhovskiy, A. B. (2007). Analysis of actin filament network organization in lamellipodia

- by comparing experimental and simulated images. *Journal of cell science*, 120(Pt 8) :1491–500.
- [Schoch et al., 2001] Schoch, S., Deák, F., Königstorfer, A., Mozhayeva, M., Sara, Y., Südhof, T. C., and Kavalali, E. T. (2001). SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5544) :1117–22.
- [Schonn et al., 2008] Schonn, J.-S., Maximov, A., Lao, Y., Südhof, T. C., and Sørensen, J. B. (2008). Synaptotagmin-1 and -7 are functionally overlapping Ca^{2+} sensors for exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(10) :3998–4003.
- [Schonn et al., 2010] Schonn, J.-S., van Weering, J. R. T., Mohrmann, R., Schlüter, O. M., Südhof, T. C., de Wit, H., Verhage, M., and Sørensen, J. B. (2010). Rab3 proteins involved in vesicle biogenesis and priming in embryonic mouse chromaffin cells. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 11(11) :1415–28.
- [Schroeder et al., 1992] Schroeder, T. J., Jankowski, J. A., Kawagoe, K. T., Wightman, R. M., Lefrou, C., and Amatore, C. (1992). Analysis of diffusional broadening of vesicular packets of catecholamines released from biological cells during exocytosis. *Analytical chemistry*, 64(24) :3077–83.
- [Seabra and Coudrier, 2004] Seabra, M. C. and Coudrier, E. (2004). Rab GTPases and myosin motors in organelle motility. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 5(6) :393–9.
- [Sechi and Wehland, 2000] Sechi, A. S. and Wehland, J. (2000). The actin cytoskeleton and plasma membrane connection : PtdIns(4,5)P(2) influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane. *Journal of cell science*, 113 Pt 21 :3685–95.
- [Seidah et al., 1993] Seidah, N. G., Day, R., and Chrétien, M. (1993). The family of pro-hormone and pro-protein convertases. *Biochemical Society transactions*, 21 (Pt 3)(3) :685–91.
- [Seidah et al., 2008] Seidah, N. G., Mayer, G., Zaid, A., Rousselet, E., Nas-soury, N., Poirier, S., Essalmani, R., and Prat, A. (2008). The activation

- and physiological functions of the proprotein convertases. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 40(6-7) :1111–25.
- [Senda and Yu, 1999] Senda, T. and Yu, W. (1999). Kinesin cross-bridges between neurosecretory granules and microtubules in the mouse neurohypophysis. *Neuroscience letters*, 262(1) :69–71.
- [Severs, 2000] Severs, N. J. (2000). The cardiac muscle cell. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 22(2) :188–99.
- [Shakiryayanova et al., 2006] Shakiryayanova, D., Tully, A., and Levitan, E. S. (2006). Activity-dependent synaptic capture of transiting peptidergic vesicles. *Nature neuroscience*, 9(7) :896–900.
- [Shennan et al., 1994] Shennan, K. I., Taylor, N. A., and Docherty, K. (1994). Calcium- and pH-dependent aggregation and membrane association of the precursor of the prohormone convertase PC2. *The Journal of biological chemistry*, 269(28) :18646–50.
- [Shirakawa et al., 2004] Shirakawa, R., Higashi, T., Tabuchi, A., Yoshioka, A., Nishioka, H., Fukuda, M., Kita, T., and Horiuchi, H. (2004). Munc13-4 is a GTP-Rab27-binding protein regulating dense core granule secretion in platelets. *The Journal of biological chemistry*, 279(11) :10730–7.
- [Siksou et al., 2009] Siksou, L., Varoqueaux, F., Pascual, O., Triller, A., Brose, N., and Marty, S. (2009). A common molecular basis for membrane docking and functional priming of synaptic vesicles. *The European journal of neuroscience*, 30(1) :49–56.
- [Sinha et al., 2011] Sinha, B., Köster, D., Ruez, R., Gonnord, P., Bastiani, M., Abankwa, D., Stan, R. V., Butler-Browne, G., Védie, B., Johannes, L., Morone, N., Parton, R. G., Raposo, G., Sens, P., Lamaze, C., and Nassoy, P. (2011). Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell*, 144(3) :402–13.
- [Smith and Farquhar, 1966] Smith, R. E. and Farquhar, M. G. (1966). Lysosome function in the regulation of the secretory process in cells of the anterior pituitary gland. *The Journal of cell biology*, 31(2) :319–47.

- [Söllner et al., 1993a] Söllner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H., and Rothman, J. E. (1993a). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*, 75(3) :409–18.
- [Söllner et al., 1993b] Söllner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., and Rothman, J. E. (1993b). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*, 362(6418) :318–24.
- [Solsona et al., 1998] Solsona, C., Innocenti, B., and Fernández, J. M. (1998). Regulation of exocytotic fusion by cell inflation. *Biophysical journal*, 74(2 Pt 1) :1061–73.
- [Song and Fricker, 1995] Song, L. and Fricker, L. D. (1995). Calcium- and pH-dependent aggregation of carboxypeptidase E. *The Journal of biological chemistry*, 270(14) :7963–7.
- [Sontag et al., 1988] Sontag, J. M., Aunis, D., and Bader, M. F. (1988). Peripheral actin filaments control calcium-mediated catecholamine release from streptolysin-O-permeabilized chromaffin cells. *European journal of cell biology*, 46(2) :316–26.
- [Sørensen, 2004] Sørensen, J. B. (2004). Formation, stabilisation and fusion of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 448(4) :347–62.
- [Sørensen, 2009] Sørensen, J. B. (2009). Conflicting Views on the Membrane Fusion Machinery and the Fusion Pore. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25 :513–37.
- [Sørensen et al., 2003] Sørensen, J. B., Nagy, G., Varoqueaux, F., Nehring, R. B., Brose, N., Wilson, M. C., and Neher, E. (2003). Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23. *Cell*, 114(1) :75–86.
- [Sørensen et al., 2006] Sørensen, J. B., Wiederhold, K., Müller, E. M., Milosevic, I., Nagy, G., de Groot, B. L., Grubmüller, H., and Fasshauer, D. (2006). Sequential N- to C-terminal SNARE complex assembly drives priming and fusion of secretory vesicles. *The EMBO journal*, 25(5) :955–66.

- [Spruce et al., 1990] Spruce, A. E., Breckenridge, L. J., Lee, A. K., and Almers, W. (1990). Properties of the fusion pore that forms during exocytosis of a mast cell secretory vesicle. *Neuron*, 4(5) :643–54.
- [Steiner, 1998] Steiner, D. F. (1998). The proprotein convertases. *Current opinion in chemical biology*, 2(1) :31–9.
- [Steyer and Almers, 1999] Steyer, J. A. and Almers, W. (1999). Tracking single secretory granules in live chromaffin cells by evanescent-field fluorescence microscopy. *Biophysical journal*, 76(4) :2262–71.
- [Steyer et al., 1997] Steyer, J. A., Horstmann, H., and Almers, W. (1997). Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells. *Nature*, 388(6641) :474–8.
- [Stiess and Bradke, 2011] Stiess, M. and Bradke, F. (2011). Neuronal polarization : the cytoskeleton leads the way. *Developmental neurobiology*, 71(6) :430–44.
- [Stinchcombe et al., 2004] Stinchcombe, J., Bossi, G., and Griffiths, G. M. (2004). Linking albinism and immunity : the secrets of secretory lysosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5680) :55–9.
- [Stinchcombe et al., 2001] Stinchcombe, J. C., Barral, D. C., Mules, E. H., Booth, S., Hume, A. N., Machesky, L. M., Seabra, M. C., and Griffiths, G. M. (2001). Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of cell biology*, 152(4) :825–34.
- [Straight et al., 2003] Straight, A. F., Cheung, A., Limouze, J., Chen, I., Westwood, N. J., Sellers, J. R., and Mitchison, T. J. (2003). Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5613) :1743–7.
- [Strasser et al., 2011] Strasser, B., Iwaszkiewicz, J., Michielin, O., and Mayer, A. (2011). The V-ATPase proteolipid cylinder promotes the lipid-mixing stage of SNARE-dependent fusion of yeast vacuoles. *The EMBO journal*, 30(20) :4126–41.
- [Sudhof, 2004] Sudhof, T. C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annual review of neuroscience*, 27 :509–47.

- [Sugihara et al., 2002] Sugihara, K., Asano, S., Tanaka, K., Iwamatsu, A., Okawa, K., and Ohta, Y. (2002). The exocyst complex binds the small GTPase RalA to mediate filopodia formation. *Nature cell biology*, 4(1) :73–8.
- [Sun-Wada et al., 2006] Sun-Wada, G.-H., Toyomura, T., Murata, Y., Yamamoto, A., Futai, M., and Wada, Y. (2006). The $\alpha 3$ isoform of V-ATPase regulates insulin secretion from pancreatic beta-cells. *Journal of cell science*, 119(Pt 21) :4531–40.
- [Sutton et al., 1998] Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R., and Brunger, A. T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*, 395(6700) :347–53.
- [Symons and Rusk, 2003] Symons, M. and Rusk, N. (2003). Control of vesicular trafficking by Rho GTPases. *Current biology : CB*, 13(10) :R409–18.
- [Tadokoro et al., 2005] Tadokoro, S., Nakanishi, M., and Hirashima, N. (2005). Complexin II facilitates exocytotic release in mast cells by enhancing Ca^{2+} sensitivity of the fusion process. *Journal of cell science*, 118(Pt 10) :2239–46.
- [Takahashi et al., 2002] Takahashi, N., Kishimoto, T., Nemoto, T., Kadowaki, T., and Kasai, H. (2002). Fusion pore dynamics and insulin granule exocytosis in the pancreatic islet. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5585) :1349–52.
- [Takahashi et al., 1995] Takahashi, S., Yamamoto, H., Matsuda, Z., Ogawa, M., Yagyu, K., Taniguchi, T., Miyata, T., Kaba, H., Higuchi, T., and Okutani, F. (1995). Identification of two highly homologous presynaptic proteins distinctly localized at the dendritic and somatic synapses. *FEBS letters*, 368(3) :455–60.
- [Takamori et al., 2006] Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Grønborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brügger, B., Ringler, P., Müller, S. A., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J. S., De Groot, B. L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., Heuser, J., Wieland, F., and Jahn, R. (2006). Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*, 127(4) :831–46.

- [Takei and Haucke, 2001] Takei, K. and Haucke, V. (2001). Clathrin-mediated endocytosis : membrane factors pull the trigger. *Trends in cell biology*, 11(9) :385–91.
- [Takiyyuddin et al., 1990] Takiyyuddin, M. a., Cervenka, J. H., Sullivan, P. a., Pandian, M. R., Parmer, R. J., Barbosa, J. a., and O'Connor, D. T. (1990). Is physiologic sympathoadrenal catecholamine release exocytotic in humans? *Circulation*, 81(1) :185–195.
- [Tang et al., 2006] Tang, J., Maximov, A., Shin, O.-H., Dai, H., Rizo, J., and Südhof, T. C. (2006). A complexin/synaptotagmin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis. *Cell*, 126(6) :1175–87.
- [Taraska and Almers, 2004] Taraska, J. W. and Almers, W. (2004). Bilayers merge even when exocytosis is transient. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(23) :8780–5.
- [Taunton, 2001] Taunton, J. (2001). Actin filament nucleation by endosomes, lysosomes and secretory vesicles. *Current opinion in cell biology*, 13(1) :85–91.
- [Taupenot et al., 2002] Taupenot, L., Harper, K. L., Mahapatra, N. R., Parmer, R. J., Mahata, S. K., and O'Connor, D. T. (2002). Identification of a novel sorting determinant for the regulated pathway in the secretory protein chromogranin A. *Journal of cell science*, 115(Pt 24) :4827–41.
- [TerBush et al., 1996] TerBush, D. R., Maurice, T., Roth, D., and Novick, P. (1996). The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal*, 15(23) :6483–94.
- [Tian et al., 2005] Tian, J.-H., Wu, Z.-X., Unzicker, M., Lu, L., Cai, Q., Li, C., Schirra, C., Matti, U., Stevens, D., Deng, C., Rettig, J., and Sheng, Z.-H. (2005). The role of Snapin in neurosecretion : snapin knock-out mice exhibit impaired calcium-dependent exocytosis of large dense-core vesicles in chromaffin cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(45) :10546–55.
- [Tolic-Norrelykke et al., 2006] Tolic-Norrelykke, S. F., Schäffer, E., Howard, J., Pavone, F. S., Jüllcher, F., and Flyvbjerg, H. (2006). Calibration of

- optical tweezers with positional detection in the back focal plane. *Review of Scientific Instruments*, 77(10) :103101.
- [Tooley et al., 2005] Tooley, A. J., Jacobelli, J., Moldovan, M.-C., Douglas, A., and Krummel, M. F. (2005). T cell synapse assembly : proteins, motors and the underlying cell biology. *Seminars in immunology*, 17(1) :65–75.
- [Toonen et al., 2006] Toonen, R. F., Kochubey, O., de Wit, H., Gulyas-Kovacs, A., Konijnenburg, B., Sørensen, J. B., Klingauf, J., and Verhage, M. (2006). Dissecting docking and tethering of secretory vesicles at the target membrane. *The EMBO journal*, 25(16) :3725–37.
- [Toonen and Verhage, 2007] Toonen, R. F. G. and Verhage, M. (2007). Munc18-1 in secretion : lonely Munc joins SNARE team and takes control. *Trends in neurosciences*, 30(11) :564–72.
- [Tooze, 1998] Tooze, S. A. (1998). Biogenesis of secretory granules in the trans-Golgi network of neuroendocrine and endocrine cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1404(1-2) :231–44.
- [Tooze et al., 1991] Tooze, S. A., Flatmark, T., Tooze, J., and Huttner, W. B. (1991). Characterization of the immature secretory granule, an intermediate in granule biogenesis. *The Journal of cell biology*, 115(6) :1491–503.
- [Trybus, 2008] Trybus, K. M. (2008). Myosin V from head to tail. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65(9) :1378–89.
- [Tsuboi and Fukuda, 2006] Tsuboi, T. and Fukuda, M. (2006). Rab3A and Rab27A cooperatively regulate the docking step of dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *Journal of cell science*, 119(Pt 11) :2196–203.
- [Tsuboi and Rutter, 2003] Tsuboi, T. and Rutter, G. A. (2003). Insulin secretion by 'kiss-and-run' exocytosis in clonal pancreatic islet beta-cells. *Biochemical Society Transactions*, 31(Pt 4) :833–836.
- [Tsuchiya et al., 2010] Tsuchiya, M., Hosaka, M., Moriguchi, T., Zhang, S., Suda, M., Yokota-Hashimoto, H., Shinozuka, K., and Takeuchi, T. (2010). Cholesterol biosynthesis pathway intermediates and inhibitors regulate glucose-stimulated insulin secretion and secretory granule formation in pancreatic beta-cells. *Endocrinology*, 151(10) :4705–16.

- [Tyska and Mooseker, 2003] Tyska, M. J. and Mooseker, M. S. (2003). Myosin-V motility : these levers were made for walking. *Trends in cell biology*, 13(9) :447–51.
- [Urbé et al., 1997] Urbé, S., Dittié, A. S., and Tooze, S. A. (1997). pH-dependent processing of secretogranin II by the endopeptidase PC2 in isolated immature secretory granules. *The Biochemical journal*, 321 (Pt 1) :65–74.
- [Urbé et al., 1998] Urbé, S., Page, L. J., and Tooze, S. A. (1998). Homotypic fusion of immature secretory granules during maturation in a cell-free assay. *The Journal of cell biology*, 143(7) :1831–44.
- [Valentijn et al., 2000] Valentijn, J. A., Valentijn, K., Pastore, L. M., and Jamieson, J. D. (2000). Actin coating of secretory granules during regulated exocytosis correlates with the release of rab3D. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(3) :1091–5.
- [Van Dyke et al., 1977] Van Dyke, K., Robinson, R., Urquilla, P., Smith, D., Taylor, M., Trush, M., and Wilson, M. (1977). An analysis of nucleotides and catecholamines in bovine medullary granules by anion exchange high pressure liquid chromatography and fluorescence. Evidence that most of the catecholamines in chromaffin granules are stored without associated ATP. *Pharmacology*, 15(5) :377–91.
- [van Weering et al., 2007] van Weering, J. R. T., Toonen, R. F., and Verhage, M. (2007). The role of Rab3a in secretory vesicle docking requires association/dissociation of guanidine phosphates and Munc18-1. *PloS one*, 2(7) :e616.
- [Varadi et al., 2003] Varadi, A., Tsuboi, T., Johnson-Cadwell, L. I., Allan, V. J., and Rutter, G. A. (2003). Kinesin I and cytoplasmic dynein orchestrate glucose-stimulated insulin-containing vesicle movements in clonal MIN6 beta-cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 311(2) :272–82.
- [Varadi et al., 2005] Varadi, A., Tsuboi, T., and Rutter, G. A. (2005). Myosin Va transports dense core secretory vesicles in pancreatic MIN6 beta-cells. *Molecular biology of the cell*, 16(6) :2670–80.

- [Varlamov et al., 1999] Varlamov, O., Wu, F., Shields, D., and Fricker, L. D. (1999). Biosynthesis and packaging of carboxypeptidase D into nascent secretory vesicles in pituitary cell lines. *The Journal of biological chemistry*, 274(20) :14040–5.
- [Varoqueaux et al., 2002] Varoqueaux, F., Sigler, A., Rhee, J.-S., Brose, N., Enk, C., Reim, K., and Rosenmund, C. (2002). Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(13) :9037–42.
- [Veit et al., 1996] Veit, M., Söllner, T. H., and Rothman, J. E. (1996). Multiple palmitoylation of synaptotagmin and the t-SNARE SNAP-25. *FEBS letters*, 385(1-2) :119–23.
- [Verhage et al., 2000] Verhage, M., Maia, A. S., Plomp, J. J., Brussaard, A. B., Heeroma, J. H., Vermeer, H., Toonen, R. F., Hammer, R. E., van den Berg, T. K., Missler, M., Geuze, H. J., and Südhof, T. C. (2000). Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5454) :864–9.
- [Verhage and Sørensen, 2008] Verhage, M. and Sørensen, J. B. (2008). Vesicle docking in regulated exocytosis. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 9(9) :1414–24.
- [Vischer and Wagner, 1994] Vischer, U. M. and Wagner, D. D. (1994). von Willebrand factor proteolytic processing and multimerization precede the formation of Weibel-Palade bodies. *Blood*, 83(12) :3536–44.
- [Vitale et al., 1991] Vitale, M. L., Rodríguez Del Castillo, A., Tchakarov, L., and Trifaró, J. M. (1991). Cortical filamentous actin disassembly and scinderin redistribution during chromaffin cell stimulation precede exocytosis, a phenomenon not exhibited by gelsolin. *The Journal of cell biology*, 113(5) :1057–67.
- [Vitale et al., 1995] Vitale, M. L., Seward, E. P., and Trifaró, J. M. (1995). Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis. *Neuron*, 14(2) :353–63.

- [Vitale et al., 2001] Vitale, N., Caumont, A. S., Chasserot-Golaz, S., Du, G., Wu, S., Sciorra, V. A., Morris, A. J., Frohman, M. A., and Bader, M. F. (2001). Phospholipase D1 : a key factor for the exocytotic machinery in neuroendocrine cells. *The EMBO journal*, 20(10) :2424–34.
- [Vitale et al., 1996] Vitale, N., Gensse, M., Chasserot-Golaz, S., Aunis, D., and Bader, M. F. (1996). Trimeric G proteins control regulated exocytosis in bovine chromaffin cells : sequential involvement of G_o associated with secretory granules and G_i3 bound to the plasma membrane. *The European journal of neuroscience*, 8(6) :1275–85.
- [Voets, 2000] Voets, T. (2000). Dissection of three Ca^{2+} -dependent steps leading to secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron*, 28(2) :537–45.
- [Voets et al., 2001a] Voets, T., Moser, T., Lund, P. E., Chow, R. H., Geppert, M., Südhof, T. C., and Neher, E. (2001a). Intracellular calcium dependence of large dense-core vesicle exocytosis in the absence of synaptotagmin I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20) :11680–5.
- [Voets et al., 1999] Voets, T., Neher, E., and Moser, T. (1999). Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron*, 23(3) :607–15.
- [Voets et al., 2001b] Voets, T., Toonen, R. F., Brian, E. C., de Wit, H., Moser, T., Rettig, J., Südhof, T. C., Neher, E., and Verhage, M. (2001b). Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking. *Neuron*, 31(4) :581–91.
- [Vogel et al., 2000] Vogel, K., Cabaniols, J. P., and Roche, P. A. (2000). Targeting of SNAP-25 to membranes is mediated by its association with the target SNARE syntaxin. *The Journal of biological chemistry*, 275(4) :2959–65.
- [Wadsworth et al., 2011] Wadsworth, P., Wei-Lih, L., Takashi, M., and Tobias I.Baskin (2011). Variations on theme : spindle assembly in diverse cells. *Protoplasma*, 248(3) :439–446.

- [Walter et al., 2010] Walter, A. M., Wiederhold, K., Bruns, D., Fasshauer, D., and Sørensen, J. B. (2010). Synaptobrevin N-terminally bound to syntaxin-SNAP-25 defines the primed vesicle state in regulated exocytosis. *The Journal of cell biology*, 188(3) :401–13.
- [Wang et al., 2001] Wang, C. T., Grishanin, R., Earles, C. A., Chang, P. Y., Martin, T. F., Chapman, E. R., and Jackson, M. B. (2001). Synaptotagmin modulation of fusion pore kinetics in regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5544) :1111–5.
- [Wang, 1987] Wang, Y. L. (1987). Mobility of filamentous actin in living cytoplasm. *The Journal of cell biology*, 105(6 Pt 1) :2811–6.
- [Wang et al., 1982] Wang, Y. L., Lanni, F., McNeil, P. L., Ware, B. R., and Taylor, D. L. (1982). Mobility of cytoplasmic and membrane-associated actin in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(15) :4660–4.
- [Wang et al., 2008] Wang, Z., Edwards, J. G., Riley, N., Provance, D. W., Karcher, R., Li, X.-D., Davison, I. G., Ikebe, M., Mercer, J. a., Kauer, J. a., and Ehlers, M. D. (2008). Myosin Vb mobilizes recycling endosomes and AMPA receptors for postsynaptic plasticity. *Cell*, 135(3) :535–48.
- [Waselle et al., 2003] Waselle, L., Coppola, T., Fukuda, M., Iezzi, M., El-Amraoui, A., Petit, C., and Regazzi, R. (2003). Involvement of the Rab27 binding protein Slac2c/MyRIP in insulin exocytosis. *Molecular biology of the cell*, 14(10) :4103–13.
- [Waselle et al., 2005] Waselle, L., Gerona, R. R. L., Vitale, N., Martin, T. F. J., Bader, M.-F., and Regazzi, R. (2005). Role of phosphoinositide signaling in the control of insulin exocytosis. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 19(12) :3097–106.
- [Washbourne et al., 2002] Washbourne, P., Thompson, P. M., Carta, M., Costa, E. T., Mathews, J. R., Lopez-Bendito, G., Molnár, Z., Becher, M. W., Valenzuela, C. F., Partridge, L. D., and Wilson, M. C. (2002). Genetic ablation of the t-SNARE SNAP-25 distinguishes mechanisms of neuroexocytosis. *Nature neuroscience*, 5(1) :19–26.

- [Watanabe et al., 2005] Watanabe, M., Nomura, K., Ohyama, A., Ishikawa, R., Komiya, Y., Hosaka, K., Yamauchi, E., Taniguchi, H., Sasakawa, N., Kumakura, K., Ushiki, T., Sato, O., Ikebe, M., and Igarashi, M. (2005). Myosin-Va regulates exocytosis through the submicromolar Ca^{2+} -dependent binding of syntaxin-1A. *Molecular biology of the cell*, 16(10) :4519–30.
- [Waters and Pfeffer, 1999] Waters, M. G. and Pfeffer, S. R. (1999). Membrane tethering in intracellular transport. *Current opinion in cell biology*, 11(4) :453–9.
- [Weber et al., 2010] Weber, J. P., Reim, K., and Sørensen, J. B. (2010). Opposing functions of two sub-domains of the SNARE-complex in neurotransmission. *The EMBO journal*, 29(15) :2477–90.
- [Weber et al., 2000] Weber, T., Parlati, F., McNew, J. A., Johnston, R. J., Westermann, B., Söllner, T. H., and Rothman, J. E. (2000). SNARE-pins are functionally resistant to disruption by NSF and alphaSNAP. *The Journal of cell biology*, 149(5) :1063–72.
- [Weber et al., 1998] Weber, T., Zemelman, B. V., McNew, J. A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Söllner, T. H., and Rothman, J. E. (1998). SNAREpins : minimal machinery for membrane fusion. *Cell*, 92(6) :759–72.
- [Weimer et al., 2006] Weimer, R. M., Gracheva, E. O., Meyrignac, O., Miller, K. G., Richmond, J. E., and Bessereau, J.-L. (2006). UNC-13 and UNC-10/rim localize synaptic vesicles to specific membrane domains. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(31) :8040–7.
- [Wendler et al., 2001] Wendler, F., Page, L., Urbé, S., and Tooze, S. A. (2001). Homotypic fusion of immature secretory granules during maturation requires syntaxin 6. *Molecular biology of the cell*, 12(6) :1699–709.
- [Werner and Grose, 2003] Werner, S. and Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews*, 83(3) :835–70.

- [Wightman et al., 1991] Wightman, R. M., Jankowski, J. A., Kennedy, R. T., Kawagoe, K. T., Schroeder, T. J., Leszczyszyn, D. J., Near, J. A., Diliberto, E. J., and Viveros, O. H. (1991). Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(23) :10754–8.
- [Wightman et al., 1995] Wightman, R. M., Schroeder, T. J., Finnegan, J. M., Ciolkowski, E. L., and Pihel, K. (1995). Time course of release of catecholamines from individual vesicles during exocytosis at adrenal medullary cells. *Biophysical journal*, 68(1) :383–90.
- [Willig et al., 2006] Willig, K. I., Rizzoli, S. O., Westphal, V., Jahn, R., and Hell, S. W. (2006). STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis. *Nature*, 440(7086) :935–9.
- [Wilson et al., 1981] Wilson, S., Slepetis, R., Chang, K., and Kirshner, N. (1981). Differential secretion of opioid peptides and catecholamines from cultured cells of a human pheochromocytoma tumor. *Life Sciences*, 29(II) :2257–2264.
- [Winkler, 1976] Winkler, H. (1976). The composition of adrenal chromaffin granules : an assessment of controversial results. *Neuroscience*, 1(2) :65–80.
- [Winkler, 1982] Winkler, H. (1982). The proteins of catecholamine-storing organelles. *Scandinavian journal of immunology. Supplement*, 9 :75–96.
- [Winkler and Westhead, 1980] Winkler, H. and Westhead, E. (1980). The molecular organization of adrenal chromaffin granules. *Neuroscience*, 5(11) :1803–23.
- [Wong et al., 2007] Wong, J. L., Koppel, D. E., Cowan, A. E., and Wessel, G. M. (2007). Membrane hemifusion is a stable intermediate of exocytosis. *Developmental cell*, 12(4) :653–9.
- [Wu et al., 2010] Wu, H., Turner, C., Gardner, J., Temple, B., and Brennwald, P. (2010). The Exo70 subunit of the exocyst is an effector for both Cdc42 and Rho3 function in polarized exocytosis. *Molecular biology of the cell*, 21(3) :430–42.

- [Xu et al., 1999] Xu, T., Rammner, B., Margittai, M., Artalejo, A. R., Neher, E., and Jahn, R. (1999). Inhibition of SNARE complex assembly differentially affects kinetic components of exocytosis. *Cell*, 99(7) :713–22.
- [Xu et al., 2005] Xu, Y., Zhang, F., Su, Z., McNew, J. A., and Shin, Y.-K. (2005). Hemifusion in SNARE-mediated membrane fusion. *Nature structural & molecular biology*, 12(5) :417–22.
- [Xue et al., 2010] Xue, M., Craig, T. K., Xu, J., Chao, H.-T., Rizo, J., and Rosenmund, C. (2010). Binding of the complexin N terminus to the SNARE complex potentiates synaptic-vesicle fusogenicity. *Nature structural & molecular biology*, 17(5) :568–75.
- [Xue et al., 2008] Xue, M., Ma, C., Craig, T. K., Rosenmund, C., and Rizo, J. (2008). The Janus-faced nature of the C(2)B domain is fundamental for synaptotagmin-1 function. *Nature structural & molecular biology*, 15(11) :1160–8.
- [Xue et al., 2007] Xue, M., Reim, K., Chen, X., Chao, H.-T., Deng, H., Rizo, J., Brose, N., and Rosenmund, C. (2007). Distinct domains of complexin I differentially regulate neurotransmitter release. *Nature structural & molecular biology*, 14(10) :949–58.
- [Yamada et al., 1988] Yamada, Y., Nakazato, Y., Ito, S., Teraoka, H., and Ohga, A. (1988). Catecholamines and dopamine-beta-hydroxylase secretion from perfused goat adrenal glands. *Quarterly journal of experimental physiology (Cambridge, England)*, 73(1) :113–21.
- [Yang and Huang, 2002] Yang, L. and Huang, H. W. (2002). Observation of a membrane fusion intermediate structure. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5588) :1877–9.
- [Yasuda et al., 2010] Yasuda, T., Shibasaki, T., Minami, K., Takahashi, H., Mizoguchi, A., Uriu, Y., Numata, T., Mori, Y., Miyazaki, J.-I., Miki, T., and Seino, S. (2010). Rim2alpha determines docking and priming states in insulin granule exocytosis. *Cell metabolism*, 12(2) :117–29.
- [Yi et al., 2002] Yi, Z., Yokota, H., Torii, S., Aoki, T., Hosaka, M., Zhao, S., Takata, K., Takeuchi, T., and Izumi, T. (2002). The Rab27a/granuphilin

- complex regulates the exocytosis of insulin-containing dense-core granules. *Molecular and cellular biology*, 22(6) :1858–67.
- [Yin and Janmey, 2003] Yin, H. L. and Janmey, P. a. (2003). Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annual review of physiology*, 65(1) :761–89.
- [Yizhar and Ashery, 2008] Yizhar, O. and Ashery, U. (2008). Modulating vesicle priming reveals that vesicle immobilization is necessary but not sufficient for fusion-competence. *PloS one*, 3(7) :e2694.
- [Yizhar et al., 2004] Yizhar, O., Matti, U., Melamed, R., Hagalili, Y., Bruns, D., Rettig, J., and Ashery, U. (2004). Tomosyn inhibits priming of large dense-core vesicles in a calcium-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(8) :2578–83.
- [Yoon et al., 2006] Yoon, T.-Y., Okumus, B., Zhang, F., Shin, Y.-K., and Ha, T. (2006). Multiple intermediates in SNARE-induced membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(52) :19731–6.
- [Youngjo Kim and Zheng, 2012] Youngjo Kim, K. M. and Zheng, Y. (2012). The function of lamins in the context of tissue building and maintenance. *Nucleus*, 3(3).
- [Yu et al., 2008] Yu, E., Kanno, E., Choi, S., Sugimori, M., Moreira, J. E., Llinás, R. R., and Fukuda, M. (2008). Role of Rab27 in synaptic transmission at the squid giant synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(41) :16003–8.
- [Zampighi et al., 2006] Zampighi, G. A., Zampighi, L. M., Fain, N., Lanzavecchia, S., Simon, S. A., and Wright, E. M. (2006). Conical electron tomography of a chemical synapse : vesicles docked to the active zone are hemi-fused. *Biophysical journal*, 91(8) :2910–8.
- [Zenisek et al., 2000] Zenisek, D., Steyer, J. A., and Almers, W. (2000). Transport, capture and exocytosis of single synaptic vesicles at active zones. *Nature*, 406(6798) :849–54.

- [Zhang et al., 1996] Zhang, L., Marcu, M. G., Nau-Staudt, K., and Trifaró, J. M. (1996). Recombinant scinderin enhances exocytosis, an effect blocked by two scinderin-derived actin-binding peptides and PIP2. *Neuron*, 17(2) :287–96.
- [Zhang et al., 2009] Zhang, Q., Li, Y., and Tsien, R. W. (2009). The dynamic control of kiss-and-run and vesicular reuse probed with single nanoparticles. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5920) :1448–53.
- [Zhang et al., 2006] Zhang, W., Lilja, L., Mandic, S. A., Gromada, J., Smidt, K., Janson, J., Takai, Y., Bark, C., Berggren, P.-O., and Meister, B. (2006). Tomosyn is expressed in beta-cells and negatively regulates insulin exocytosis. *Diabetes*, 55(3) :574–81.
- [Zhang et al., 2001] Zhang, X., Bi, E., Novick, P., Du, L., Kozminski, K. G., Lipschutz, J. H., and Guo, W. (2001). Cdc42 interacts with the exocyst and regulates polarized secretion. *The Journal of biological chemistry*, 276(50) :46745–50.
- [Zhang and Jackson, 2008] Zhang, Z. and Jackson, M. B. (2008). Temperature dependence of fusion kinetics and fusion pores in Ca²⁺-triggered exocytosis from PC12 cells. *The Journal of general physiology*, 131(2) :117–24.
- [Zhang and Jackson, 2010] Zhang, Z. and Jackson, M. B. (2010). Membrane bending energy and fusion pore kinetics in Ca(2+)-triggered exocytosis. *Biophysical journal*, 98(11) :2524–34.
- [Zhou et al., 1996] Zhou, Z., Mislser, S., and Chow, R. H. (1996). Rapid fluctuations in transmitter release from single vesicles in bovine adrenal chromaffin cells. *Biophysical journal*, 70(3) :1543–52.
- [Zilly et al., 2006] Zilly, F. E., Sørensen, J. B., Jahn, R., and Lang, T. (2006). Munc18-bound syntaxin readily forms SNARE complexes with synaptobrevin in native plasma membranes. *PLoS biology*, 4(10) :e330.

ANNEXE B

Articles

Myrip Couples the Capture of Secretory Granules by the Actin-Rich Cell Cortex and Their Attachment to the Plasma Membrane

Sébastien Huet,^{1,2*} Isabelle Fanget,^{3*} Ouardane Jouannot,³ Patricia Meireles,³ Tim Zeiske,³ Nathanaël Laroche,³ François Darchen,^{3*} and Claire Desnos^{3*}

¹Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 6290, Institut Génétique et Développement de Rennes and ²Faculté de Médecine, Université Rennes 1, Université Européenne de Bretagne, Fédération de recherche Biosit, F-35043 Rennes, France, and ³Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, UMR 8192, 75270 Paris cedex 06, France

Exocytosis of secretory granules (SGs) requires their delivery to the actin-rich cell cortex followed by their attachment to the plasma membrane (PM). How these reactions are executed and coordinated is still unclear. Myrip, which is also known as Slac-2c, binds to the SG-associated GTPase Rab27 and is thought to promote the delivery of SGs to the PM by recruiting the molecular motor myosin Va. Myrip also interacts with actin and the exocyst complex, suggesting that it may exert multiple roles in the secretory process. By combining total internal reflection fluorescence microscopy, single-particle tracking, a photoconversion-based assay, and mathematical modeling, we show that, in human enterochromaffin cells, Myrip (1) inhibits a class of SG motion characterized by fast and directed movement, suggesting that it facilitates the dissociation of SGs from microtubules; (2) enhances their motion toward the PM and the probability of SG attachment to the PM; and (3) increases the characteristic time of immobilization at the PM, indicating that it is a component of the molecular machinery that tether SGs to the PM. Remarkably, while the first two effects of Myrip depend on its ability to recruit myosin Va on SGs, the third is myosin Va independent but relies on the C-terminal domain of Myrip. We conclude that Myrip couples the retention of SGs in the cell cortex, their transport to the PM, and their attachment to the PM, and thus promotes secretion. These three steps of the secretory process are thus intimately coordinated.

Introduction

Secretory granules (SGs) store water-soluble hormones and release them by exocytosis. A wealth of mechanistic information has been obtained on membrane fusion, but less is known on the recruitment of SGs at the cell periphery and their attachment to the plasma membrane (PM), which is required for the formation of a pool of ready-to-fuse SGs (Verhage and Sorensen, 2008). SGs are formed at the trans-Golgi network and transported along microtubules to the cell periphery (Rudolf et al., 2001). They cannot be transferred directly from microtubules to the PM, but diffuse within the actin-rich cortex until they find an attachment site or undergo another microtubule-based run (Huet et al., 2006). Tethering organelles to the actin cortex is thought to promote their dissociation from microtubules and their accumula-

tion at the cell periphery, and thus secretion (Seabra and Coudrier, 2004; Darchen and Desnos, 2012). However, excessive binding to actin restricts the mobility of SGs and their availability for release (Desnos et al., 2003). Actin dynamics (Malacombe et al., 2006) as well as molecular motors such as myosin Va (MyoVa) are thought to facilitate the motion of SGs through the actin-rich layer.

MyoVa is associated with SGs and its inhibition impairs SG docking and secretion (Rose et al., 2003; Rudolf et al., 2003, 2011; Varadi et al., 2005; Desnos et al., 2007b). MyoVa is recruited on SGs by the GTPase Rab27a and Myrip (Fukuda and Kuroda, 2002; Desnos et al., 2003; Waselle et al., 2003; Imai et al., 2004). Myrip, which is also known as Slac-2c, is expressed on SGs and retinal melanosomes (Darchen and Desnos, 2012), and like MyoVa, Rab27a, and Rab27b, it controls secretion (Desnos et al., 2003; Waselle et al., 2003; Imai et al., 2004; Ivarsson et al., 2005; Mizuno et al., 2011). Myrip interacts with Rab27:GTP via an N-terminal helix, and with myosin VIIa or MyoVa via a central domain (El-Amraoui et al., 2002; Fukuda and Kuroda, 2002; Desnos et al., 2003; Kuroda and Fukuda, 2005; Klomp et al., 2007; Lopes et al., 2007; Ramalho et al., 2009). Interestingly, through its C-terminal region, Myrip also interacts with sec6 and sec8, two components of the exocyst complex, and with actin (El-Amraoui et al., 2002; Fukuda and Kuroda, 2002; Desnos et al., 2003; Goehring et al., 2007), suggesting that Myrip can exert MyoVa-independent functions.

Received June 1, 2011; revised Dec. 2, 2011; accepted Dec. 23, 2011.

Author contributions: S.H., F.D., and C.D. designed research; I.F., O.J., P.M., T.Z., N.L., and C.D. performed research; S.H., I.F., O.J., P.M., F.D. and C.D. analyzed data; F.D. and C.D. wrote the paper.

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique. F.D. was supported by INSERM. We thank Philippe Rostaing and Laure Wingertsman from the electronic microscopy platform at the Ecole Normale Supérieure, Paris, and Dr. Ana-Maria Lennon-Duménil for her critical reading of this manuscript.

*S.H., I.F., F.D., and C.D. contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to Dr. François Darchen, Université Paris Descartes, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR8192, 45 Rue des Saints-Pères, 75270 Paris Cedex 06, France. E-mail: francois.darchen@parisdescartes.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.2724-11.2012

Copyright © 2012 the authors 0270-6474/12/322564-14\$15.00/0

Here, we measured the dynamics of SGs beneath the PM in neuroendocrine cells using total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) combined with single-particle tracking and incorporated the data into a mathematical compartment model of SG trafficking. We found that Myrip plays a dual role in SG dynamics. First, Myrip recruits MyoVa and promotes the retention of SGs in the actin-rich cortex and their transport toward the PM. Second, it allows their docking at the PM. By coupling the delivery of SGs to the PM and the docking reaction, Myrip thus plays a key role in the secretory process.

Materials and Methods

Materials

Anti-chromogranin A/B antibodies were from Abcam; goat anti-Myrip antibodies were from Everest Biotechnology. The anti-myosin Va (Espreafico et al., 1992) was a gift from R. E. Cheney (University of North Carolina, Chapel Hill, NC) or obtained from Sigma (LF-18); anti-actin (AC-74) and anti tubulin (TUB 2.1) antibodies were from Sigma, and anti-Myc 9B11 was from Cell Signaling Technology. Cell culture reagents were obtained from PAA Laboratories. DNA purifications were done using kits from Macherey-Nagel. Enzymes for molecular biology were from New England Biolabs.

Constructs

To generate a plasmid encoding Dendra2-tagged neuropeptide-Y (NPY), p-Dendra2C (Evrogen) was digested using BamHI/EcoRI and subcloned into pCDNA3.1. The resultant plasmid was cut with BamHI/NotI, and the fragment was used to replace the BamHI-NotI fragment in pNPY-GFP to generate an in-frame fusion between NPY and Dendra2. The sequence of inserts was confirmed by automated DNA sequencing. pcDNA3-mycRab11b was a gift from M. Cormont (INSERM U895, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Nice, France). Vectors encoding human Myc-tagged-Myrip constructs, human myosin Va, and NPY constructs have been described previously (El-Amraoui et al., 2002; Desnos et al., 2007b). To generate a Myrip rescue construct, three silent mutations corresponding to nucleotides 2, 9 and 11 of Myrip-siRNA1 (sense strand) were introduced by PCR-based mutagenesis in the Myc-tagged Myrip construct. We verified by immunofluorescence that the expression of this rescue construct was not reduced by Myrip-siRNA1, in contrast to that of the original Myrip construct.

Cell culture, transfection, and silencing

The BON cell line has been established from a lymph nod metastasis of a human pancreatic carcinoid tumor (Evers et al., 1991) and were provided by C. M. Townsend (University of Texas, Medical Branch, Galveston, TX). In culture, a large majority of the cells extend several processes enriched in SGs. Cells were cultured in Ham's F-12/DMEM with 10% FBS at 37°C under 5% CO₂. Cells were plated onto collagen-coated glass coverslips before transfection. TIRFM observations were made on collagen-coated glass-bottom dishes (MatTEK or World Precision Instruments). siRNA duplexes were provided by MWG Biotech. We used three already validated siRNAs directed against human MyoVa (MyoVa-siRNA1, 5'-GAACAAUGUGCACUCUUUUU; MyoVa-siRNA2, 5'-AAAGUAAGGUCGUUGCUAAUU; MyoVa-siRNA3, 5'-AACUGACUACUGAAUGAUGA) (Desnos et al., 2007b; Lindsay and McCaffrey, 2011) and two siRNAs targeting Myrip (Myrip-siRNA1, 5'-UAAGUGAGCU GAAGCAGAAUU; Myrip-siRNA2, 5'-UGGCAGUGAUUCAACAUU). The control siRNAs targeting EGFP or luciferase were from Eurofin MWG Operon. Transfection of siRNAs (30 nM) was done with interferin (Polyplus Transfection). Twenty-four hours later, cells were transfected with plasmids using lipofectamine 2000 (Invitrogen). In some cases, BON cells were transfected by electroporation in the presence of siRNA (120 nM) and 24 h later with siRNAs and interferin. In brief, 1.5 × 10⁶ cells were collected in 50 μl of PBS containing vector DNAs (2–5 μg), electroporated (600 V/cm, 8 × 3 ms) using a PS10 electropulsator (Jouan), and recovered in warm culture medium before plating. Experiments were done 72 h after initiation of RNA interference. Cell extracts

were prepared in parallel for Western blot analysis for protein expression. The blots were scanned and quantified using Image J software (rsbweb.nih.gov/ij/). Levels of actin or tubulin were used to normalize the results from different samples.

Coimmunoprecipitation

BON cells were transfected 2 d before the experiment with vectors encoding myc-tagged Myrip and GFP-MyoVa tail. Immunoprecipitation was performed as described previously (Desnos et al., 2003) on cell homogenates prepared in 1% Triton X-100 in the presence of 2 μM latrunculin B (Calbiochem) to recover Myrip that otherwise bound strongly to actin filaments. Extracts were incubated with protein G-Sepharose beads (GE Healthcare) conjugated with required antibodies at 4°C for 2 h. After extensive washes and elution in Laemmli sample buffer, eluates were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting.

Immunofluorescence microscopy

Immunocytochemistry was performed as described previously (Desnos et al., 2003). Secondary antibodies were coupled to Cy-3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories), Alexa-488, Alexa-568, or Alexa-350 (Invitrogen). Cells were visualized using a z-motorized Nikon inverted microscope TE2000E equipped with a 100× objective (NA, 1.4) and a CoolSnap ES CCD camera (Roper Scientific). When indicated, Z-series were acquired with Δz = 200 nm, and image stacks were restored using the MetaMorph point spread function-based deconvolution software (Molecular Devices). To evaluate the association of MyoVa with SGs, cells were imaged using the same laser and camera settings. We first identify SGs as NPY-monomeric red fluorescent protein (mRFP)-labeled structures whose brightest pixel had a fluorescence intensity >1.25 times that of the background fluorescence measured in several areas of the cell. Then, we categorized a SG as MyoVa positive if the green fluorescence of this brightest pixel was >1.25 times that of the background green fluorescence of this cell.

High-pressure freezing immunoelectron microscopy

BON cells were cultured on thermanox coverslips (Nunc) and fitted in a 6 mm specimen carrier for rapid freezing in a Leica HPM 100 machine under high pressure (2100 bars). Samples were then rapidly transferred to liquid nitrogen for storage. Cryosubstitution and embedding were performed in a Reichert AFS apparatus (Leica), first in acetone with 0.1% tannic acid at -90°C for 40 h with one change of solution, and then in acetone with 2% osmium during the last 7 h. The cultures were slowly (5°C/h) warmed to -20°C and incubated for additional hours before being warmed (10°C/h) to 4°C. After several rinses with acetone, the samples were warmed to room temperature and incubated in 50% acetone/50% Araldite (Polysciences) for 1 h, followed by 10% acetone/90% Araldite for 2 h. They were then incubated twice in pure Araldite for 2 h. Coverslips were mounted on resin block and cut in parallel to the plan of cells after removing the thermanox coverlip. Sections (80 nm thick) were cut using a Leica Ultracut E, counterstained by incubation with 2% uranyl in water for 10 min and lead citrate for 10 min. The sections were observed in a Philips TENAI 12 (FEI).

TIRFM

TIRFM setup. BON cells were transferred into Locke's solution containing the following (in mM): 5.6 glucose, 3.6 HCO₃⁻, 159.6 Cl⁻, 157.6 Na⁺, 5.6 K⁺, 5 HEPES-NaOH, 2.5 CaCl₂, 1.2 MgCl₂. TIRFM imaging was performed on a custom setup described previously (Huet et al., 2006). The penetration depth δ (the distance along the z-axis over which fluorescence declines e-fold) of the evanescent field used to excite the fluorophore was set to 150 nm. Under the conditions of observation used, one pixel corresponded to 107.5 nm. Stream acquisitions were performed at 9.98 Hz for 40–60 s with an exposure time of 100 ms. Selective excitation was obtained using argon laser lines at 488 and 514 nm, and optical filters (bandpass, 500–540 nm; high-pass, >565 nm) were used for the emission (Melles Griot).

Image analysis. The density of fluorescent structures was evaluated using Multidimensional Image Analysis (MIA) software (a segmentation algorithm based on wavelets) (Racine et al., 2006) and expressed as the number of NPY-positive structures observed in the evanescent field divided by the size of the cell footprint.

From stacks of images, two-dimensional (x - y) trajectories were obtained by single-particle tracking using MIA software. Mean square displacement (MSD) in the x - y plane was computed using custom routines, and the diffusion coefficient D_{xy} was then calculated as $D_{xy} = s/4$, with s being the slope of the linear fit to the first 15 points of the MSD curve. To measure D_{xy} variations along a given trajectory, a rolling analysis window of 2.5 s was used. For each position of the window, D_{xy} was calculated as described above, and the obtained value was assigned to each point of the trajectory included in this window. Since each point of the trajectory appears in different windows, several D_{xy} values were assigned to each point and finally averaged. Immobilization periods were defined as portions of trajectories during which D_{xy} drops below a threshold value $D_{\min} = 5 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, i.e., five times the minimal D_{xy} measurable with our experimental setup (estimated from the tracking of fluorescent beads immobilized on the coverslip) (Huet et al., 2006). As random walk trajectories may also feature periods of slow motion, we used the duration of immobilization periods as a further criterion of SG attachment. Survival curves for immobilization times (i.e., the cumulative number of immobilization events per trajectory plotted as a function of their minimum duration) were computed for each cell and averaged over the different cells. The best fit for the curves was obtained with the sum of two exponentials, $N(t) = N_1 \exp(-t/\tau_1) + N_2 \exp(-t/\tau_2)$, using SigmaPlot (Systat Software). N_1 and N_2 represent the abundance of each component, and τ_1 and τ_2 their time constants, respectively. The long-lasting component was taken as an index of SG stalling.

Minimizing the cross talk between attachment to the PM and diffusive periods. Based on the two characteristic times observed in survival plots of immobilization times, we calculated a threshold value for the immobilization duration to separate long-lasting immobilization periods from the poorly defined short-lasting immobilization periods. This threshold was calculated to minimize the cross talk between the two populations in the survival curves. The normalized distributions for the short ($D_s(t)$) and long ($D_l(t)$) immobilization periods are given by the following equations:

$$D_s(t) = \frac{1}{\tau_s} \exp\left(-\frac{t}{\tau_s}\right); \quad (1)$$

$$D_l(t) = \frac{1}{\tau_l} \exp\left(-\frac{t}{\tau_l}\right). \quad (2)$$

For a given threshold t_{thresh} , the cross talk between the two distributions is equal to the following:

$$I(t_{\text{thresh}}) = \int_0^{t_{\text{thresh}}} D_l(t) dt + \int_{t_{\text{thresh}}}^{\infty} D_s(t) dt. \quad (3)$$

By calculating the two integrals, we obtain the following:

$$I(t_{\text{thresh}}) = 1 + \exp\left(-\frac{t_{\text{thresh}}}{\tau_s}\right) - \exp\left(-\frac{t_{\text{thresh}}}{\tau_l}\right). \quad (4)$$

It is thus possible to obtain the threshold duration which minimizes the cross talk between the two populations:

$$t_{\text{thresh}} = \frac{\tau_s \times \tau_l}{\tau_l - \tau_s} * \ln\left(\frac{\tau_l}{\tau_s}\right) \quad (5)$$

Based on this calculation, we obtained threshold durations between 6 and 8.5 s for the different experiments. Subtrajectories corresponding to directed motion were manually selected; stalled periods include all immobilization periods lasting longer than the threshold value defined above. The remaining subtrajectories were considered as diffusive.

Detection of false positive stalling periods within simulated Brownian trajectories and diffusing fluorescent beads. Three-dimensional random walk trajectories were simulated as described by Huet et al. (2006). The diffusion coefficient ($25 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), length of the trajectories (10 to 20 s) and time step between consecutive positions (0.1 s) were chosen

to match the values obtained for SGs. Stalling events were detected with the approach used for SGs. The survival curves for immobilization times were based on the simulation of 5000 trajectories.

Time-lapse stacks displaying the diffusion of latex fluorescent beads (500 nm in diameter) within a glycerol/water mix (75–80% of glycerol by volume) were acquired by TIRF microscopy. The beads were tracked using the MIA software. The average diffusion coefficient of these beads ($D_{xy} \approx 130 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) was approximately five times higher than the value measured for SGs in control conditions. However, to properly estimate the contribution of false positive stalling events within the SG survival curves using the analysis of the bead dynamics, it was necessary to match the ratio between the average diffusion coefficient and the threshold value D_{\min} for the beads and the SGs. Consequently, stalling periods within bead trajectories were detected with a threshold $D_{\min} = 25 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ and not $5 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, as used for the SGs. The survival curves for immobilization times were based on 69 bead trajectories whose duration matches that of SGs (~ 16 s).

Estimation of the diffusion anomaly. In case of anomalous subdiffusion, the MSD curves can be fitted by the following:

$$\text{MSD} \propto D \cdot \Delta t^\alpha, \quad (6)$$

with $\alpha \leq 1$. In the logarithmic representation, Equation 1 becomes

$$\log(\text{MSD}) \propto \alpha * \log(\Delta t). \quad (7)$$

Thus, the MSD curves calculated from the SG trajectories were plotted in logarithmic representation and fitted using a linear regression, the slope of the fit corresponding to the anomaly parameter α . For the estimation of the diffusion anomaly during stalling and nonstalling periods, the MSD curves were calculated for stretches of trajectories lasting >5 s. A median MSD was calculated for each cell, and the fit was performed over the first 25 points of each MSD curve.

Measuring peripheral SG retention by photoconversion of NPY-Dendra2. NPY was fused to Dendra2. Dendra2 is a photoactivable fluorescent protein whose emission spectrum shifts from green to red upon brief UV light exposure (Chudakov et al., 2007). A 405 nm diode laser (50 mW; Laser Components) was coupled to our TIRF microscope and aligned with the argon laser using a dichroic mirror. Two days after transfection with NPY-Dendra2, Myrip siRNA, or Myrip constructs, the cells were observed by TIRFM with a penetration depth of 100 nm. A 2 s exposure to UV evanescent light was sufficient to photoconvert $64 \pm 8\%$ ($n = 15$ cells) of the green vesicles present in the TIRFM field. Red signals three times above the background were obtained. Increasing the photoactivation time over 2 s did not significantly increase the red signal but increased the variability. After photoconversion, images were acquired for 1 min at 0.5 Hz using an exposure time of 200 ms. Dendra2 was not significantly photoconverted by such illumination at 514 nm. Images were quantitated using ImageJ. For each cell, the background was measured in areas devoid of SGs and subtracted to all pixel values. Cell boundaries were manually drawn, and the total fluorescence intensity was integrated over the depicted area. Alternatively, images were segmented using MIA software, and the number of vesicles was counted on each frame. Photobleaching was estimated on live cells by measuring the fluorescence decay of immobile SGs, yielding an upper bound estimate of bleaching since immobile SGs are generally attached to the PM and thus close to the interface where the TIRF field is generated. Diffusion of NPY-mRFP within individual SGs may also contribute to the diminution of the fluorescence signal over time. However, this fluorescence loss is likely to be the same under the different conditions since we found, using electron microscopy, that Myrip siRNAs do not change the size of SGs.

Simulation of the photoconversion experiments. To simulate the photoconversion experiments, we built up a kinetic model in which SGs can occupy different states: “C” for SGs localized at the cell center, “A” for SGs in the actin cortex, and “D” for SGs attached to the PM. TIRF microscopy does not allow imaging all the SGs present at the cell cortex but only those which are localized in the vicinity of the glass coverslip. To account for this limitation, we included in the model two peripheral SG populations, only one of them being accessible by TIRF imaging.

Due to the short evanescent depth used for photoconversion (~ 80 nm at 405 nm) most of the photoconverted NPY-Dendra labeled SGs were considered as docked at the PM immediately after the photoconversion. We used this initial condition for starting our simulations. Since the evanescent depth used for imaging is longer than the one used for photoconversion (100 nm instead of 80 nm), we considered that we were imaging all the docked SGs and 25% of the SGs located in the actin cortex. Because this proportion p_{act} of SGs located in the actin cortex which can be imaged using a 100 nm evanescent depth could not be estimated precisely, we performed simulations in which the value of p_{act} ranged between 0 and 50%. In all cases, we observed a biphasic behavior, the fast phase corresponding to the equilibration between the pool at the PM and the one in the actin, and the slow phase associated with SG movement toward the cell interior. Varying p_{act} from 0 and 50% only led to a moderate change in the relative amplitude of the two phases (data not shown).

The exchange rates between the three states were derived from the analysis of SG dynamics by TIRF microscopy (Table 1). To estimate the rates k_1 and k_1' corresponding to the transition $C \rightarrow A$ and $C \rightarrow A'$, with A' being the population of SGs in the actin-rich layer not visible in TIRFM, we had to estimate the relative SG populations in the different compartments at steady state. Based on the images obtained by electron microscopy, we observed that about two-thirds of the SGs display a cortical localization in control cells. Our analysis of SG mobility also showed that, in control conditions, the density of SGs in the actin cortex and at the PM are similar ($A \approx D$). Finally, we estimated the proportion of SGs imaged by TIRF as compared to the total number of SGs in the cell. On deconvolved wide-field images of NPY-GFP-expressing BON cells, we counted a total number of labeled vesicles of ~ 1500 SGs. Knowing that we observed ~ 150 SGs by TIRF, we considered that $\sim 10\%$ of the total number of labeled SGs were visible with this approach. Together, these different results allowed estimating the steady SG populations in the different compartments. We obtained $C \approx 33\%$, $A \approx D \approx 8\%$, and $A' \approx D' \approx 25.5\%$. Since $k_1 = k_{-1} * A/C$ and $k_1' = k_{-1} * A'/C$, at steady state, we could estimate that, in the control cells, $k_1 \approx k_{-1} * 0.24$ and $k_1' \approx k_{-1} * 0.77$.

Statistical analyses

Values are given as mean \pm SE. The significance of differences between two conditions was calculated with Mann–Whitney U test or Student's t test when data were normally distributed. For multiple comparisons, we used the Kruskal–Wallis test or ANOVA (normal distribution), followed by Dunn's or Tukey's post-tests, respectively, using GraphPad Prism version 5.04.

Results

Myrip recruits MyoVa on secretory granules

Myrip forms a complex with MyoVa and Rab27a and is therefore thought to mediate the recruitment of MyoVa onto SGs. To test this possibility, we measured the association of a GFP-tagged construct comprising the globular tail of MyoVa and the exons A, C, E and F (GFP-MyoVa tail) with SGs in an enterochromaffin cell line (BON) derived from a human carcinoid tumor. BON cells store various peptides and serotonin in SGs and secrete them (Kim et al., 2001). They express Rab27a, Myrip, and MyoVa and the three proteins are associated with SGs as in other endocrine cells (Fig. 1) (Desnos et al., 2003, 2007b). Under control conditions, 60% of the NPY-mRFP labeled SGs were decorated with a GFP-MyoVa tail (Fig. 1A–C,H). In contrast, in cells treated with a silencing RNA duplex (siRNA) directed to Myrip mRNA (Fig. 1G), the fraction of SGs labeled by GFP-MyoVa tail was reduced to $\sim 20\%$ (Fig. 1D–F,H). Moreover, in $\sim 60\%$ of Myrip-siRNA-treated cells, the GFP-MyoVa tail exhibited a marked soluble cytosolic pattern without any visible enrichment on intracellular structures (Fig. 1I,J). Such increased cytosolic distribution was observed only in 22% of control cells. Overall, the intensity of the cytosolic GFP-MyoVa tail in cell regions devoid of SGs was doubled in Myrip-siRNA-treated cells compared to control cells

(mean fluorescence intensity, control cells, 288 ± 32 ; Myrip knockdown cells, 595 ± 58 ; $p < 0.0001$; $n = 30$ cells). The association of MyoVa with SGs was rescued by expressing an siRNA-insensitive Myrip construct, arguing against an off-target effect of Myrip siRNAs (Fig. 1H). These observations indicate that Myrip is needed for the recruitment of MyoVa on SGs.

The intracellular distribution of SGs depends on Myrip

Next, we analyzed the effect of Myrip on the intracellular distribution of SGs. In the majority of control cells, SGs accumulate at the cell periphery and in cell extensions (Figs. 1, 2A, left). In contrast, SGs were evenly distributed in the cytoplasm or concentrated near the nucleus (Fig. 2A, middle, right) in most of the Myrip knockdown cells and in cells in which the Rab-binding domain of Myrip (Myrip-RBD) was expressed to inhibit the binding of endogenous Myrip to Rab27a (Fig. 2B). This effect was first evaluated by visual inspection of cells and manual determination of the fraction of cells exhibiting at least one cell extension with a SG density higher than in the cell center (Fig. 2B). A more quantitative analysis of the mean distance of SGs to the cell center confirmed these results (Fig. 2C). Noteworthy is that the effect of Myrip silencing on SG distribution was rescued by expressing a siRNA-insensitive Myrip construct (Fig. 2B,C). Finally, BON cells were imaged by TIRFM to image NPY-labeled SGs present in the subplasmalemmal region (Huet et al., 2006; Desnos et al., 2007b). Most of the SGs observed by TIRFM are localized within the actin-rich cell cortex or at the PM (Oheim and Stuhmer, 2000; Johns et al., 2001; Huet et al., 2006). Myrip silencing and overexpression of Myrip-RBD significantly diminished the number of SGs present in the evanescent field, compared with control cells (Fig. 2D). In contrast, overexpression of full-length Myrip (Myrip-FL) but not of a C-terminally truncated Myrip (Myrip- ΔC , 1–665) had a tendency to increase SG density in the subplasmalemmal region (Fig. 2D), suggesting that the C-terminal region of Myrip contributes to SG retention, although it is not needed for the interaction with MyoVa (Desnos et al., 2003; Kuroda and Fukuda, 2005). We conclude that Myrip promotes the recruitment or the retention (“capture”) of SGs near the PM.

To characterize the effect of Myrip on SG distribution by independent means, we measured the distance of SGs to the PM by electron microscopy. BON cells were treated for 3 d with control siRNAs or Myrip siRNAs, fixed by high-pressure freezing and embedded after cryosubstitution. This technique was shown to preserve the cell architecture and the position of vesicles with respect to the PM (Siksou et al., 2007). Electron-dense SGs were easily identified on EM pictures (Fig. 3A), and their distance to the PM was determined. In agreement with TIRFM data, the number of SGs positioned within 300 nm of the PM was reduced in Myrip knockdown cells, compared with control cells (Fig. 3B). Interestingly, the effect of Myrip silencing on the number of SGs very close to the PM (< 50 nm) or morphologically attached to the PM (< 15 nm) was even more pronounced. Noteworthy, Myrip silencing had no effect on the size of SGs (not shown) or on the total number of SGs (cells treated with control siRNAs, 2.17 ± 0.27 SG/ μm^2 , $n = 32$ cells; Myrip knockdown cells, 2.32 ± 0.54 SG/ μm^2 , $n = 30$ cells).

In agreement with this defect in SG recruitment at the PM, Myrip silencing reduced the secretion of serotonin in BON cells (Fig. 2E), as it does in other neuroendocrine cells (Fukuda and Kuroda, 2002; Desnos et al., 2003; Waselle et al., 2003; Imai et al., 2004; Ivarsson et al., 2005; Mizuno et al., 2011).

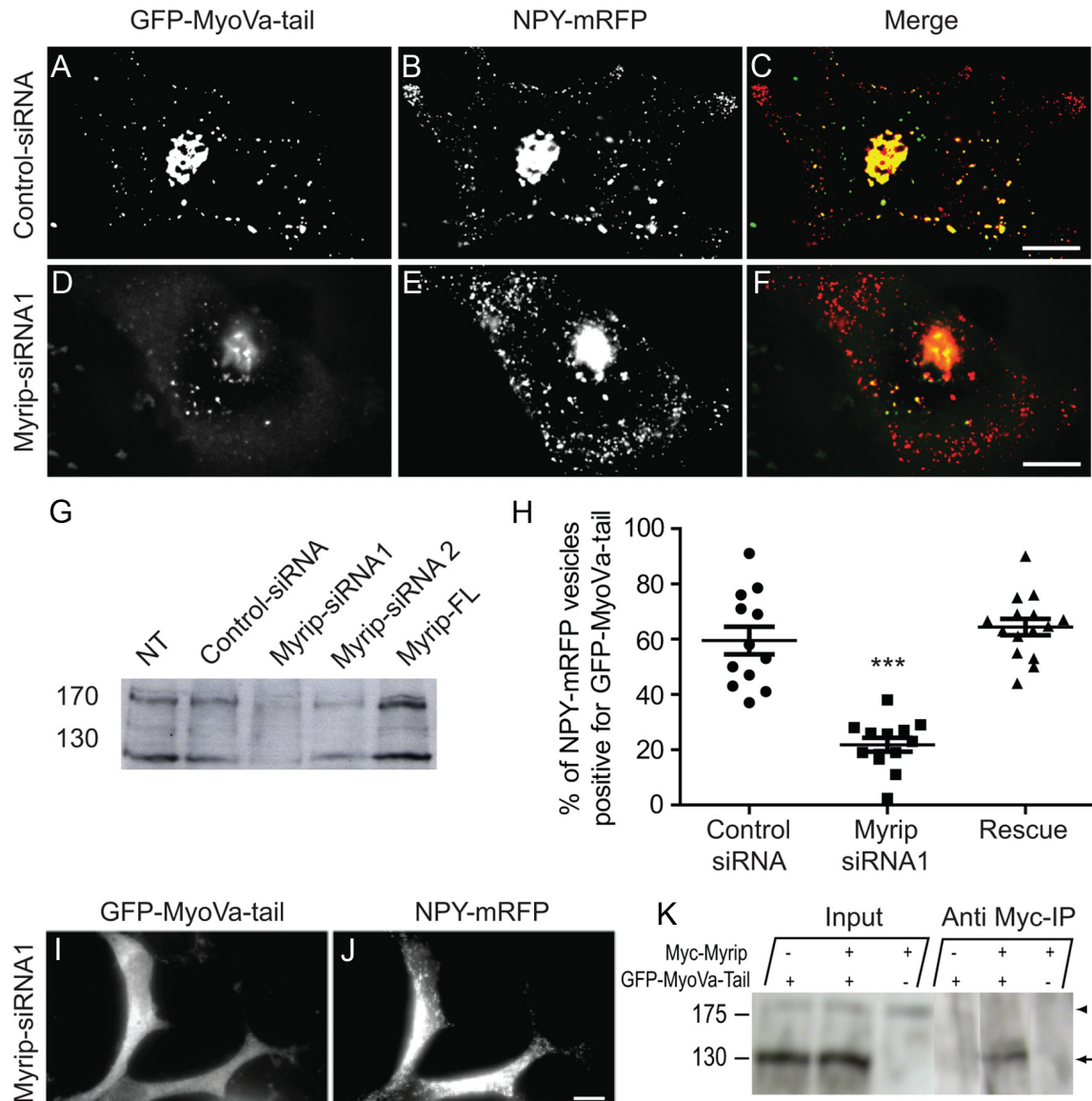


Figure 1. Myrip recruits myosin Va onto SGs. **A–F**, To evaluate the association of MyoVa to SGs, BON cells were successively transfected with NPY-mRFP (**B, E**) and with GFP-MyoVa tail (**A, D**) 3 d and 16 h before cell fixation, respectively. In addition, cells were transfected with luciferase-targeting siRNAs as a control (**A–C**) or with Myrip siRNA1 (**D–F**). Z-stacks of epifluorescence images were restored by deconvolution. **G**, Knockdown of Myrip expression. Three days after transfection of siRNAs, Myrip levels were analyzed by immunoblotting in nontransfected (NT) cells, in cells treated with a control siRNA, with siRNAs directed to Myrip mRNA, and in cells overexpressing Myrip-FL. Myrip levels were lowered by $80 \pm 1.8\%$ (Myrip-siRNA1) or by $63 \pm 1.8\%$ (Myrip-siRNA2; $n = 3$). The result of a typical experiment is shown. **H**, Shown is the percentage of NPY-mRFP-labeled SGs that were also decorated with a GFP-MyoVa tail, a construct comprising the globular tail of MyoVa and the exons A, C, E, and F. The targeting of the GFP-MyoVa tail to SGs was reduced by Myrip silencing and rescued by expressing a siRNA1-insensitive Myrip construct (rescue) ($p < 0.0001$, ANOVA). Asterisks refer to a Tukey's post-test; $***p < 0.001$; $n = 15$ cells from two experiments. Cells expressing the rescue construct were identified using an anti-c-Myc antibody and an Alexa-350-labeled secondary antibody. Noteworthy is that the expression of the GFP-MyoVa tail was not reduced by Myrip silencing. **I, J**, Moreover, in $\sim 60\%$ of Myrip-siRNA1-treated cells, the GFP-MyoVa tail exhibited a marked soluble cytosolic pattern without any visible enrichment on intracellular structures. **K**, Coimmunoprecipitation of Myrip and myosin Va. Coimmunoprecipitation of the GFP-MyoVa tail with myc-tagged Myrip after expression in BON cells is shown. Immunoprecipitation was done with an anti-myc antibody and immunoblotting with anti-MyoVa antibodies. One-fifteenth of cell extracts and one-fourth of immunoprecipitates were analyzed. The positions of endogenous MyoVa and the MyoVa tail are shown by an arrowhead and an arrow, respectively. Scale bars: $5 \mu\text{m}$.

Myrip promotes the peripheral retention of SGs

To determine whether the decreased SG density beneath the PM was due to impaired delivery or retention of SGs, we designed an assay to measure the time spent by SGs in the evanescent field. A 405 nm laser diode was coupled to our TIRF microscope and used to photoconvert SG-targeted NPY-Dendra2. A short UV illumination induced a green-to-red shift of the fluorescence emission of Dendra2 in the subset of SGs present in the evanescent field (Fig. 4A, B). In agreement with the effect of Myrip on SG density in the TIRF area (Fig. 2D), Myrip-FL, but not Myrip- ΔC , increased the integrated fluorescence of NPY-Dendra2 measured immediately after photoconversion (data not shown). In con-

trast, Myrip knockdown reduced this value. Both the fluorescence intensity (Fig. 4C) and the number of visible SGs (Fig. 4D) decreased over time. The decay is likely to reflect SG motion toward the cell interior since under resting conditions secretion is extremely low and cannot contribute to the observed fluorescence decay. Myrip-FL slowed the decay of both the number of labeled SGs and fluorescence intensity, whereas Myrip siRNAs accelerated it, indicating that Myrip promotes the retention of SGs at the cell periphery. Interestingly, Myrip- ΔC slowed the decay of the number of SGs kept in the evanescent field but accelerated the fluorescence loss, suggesting that the overexpression of Myrip- ΔC increased the distance of the SGs to

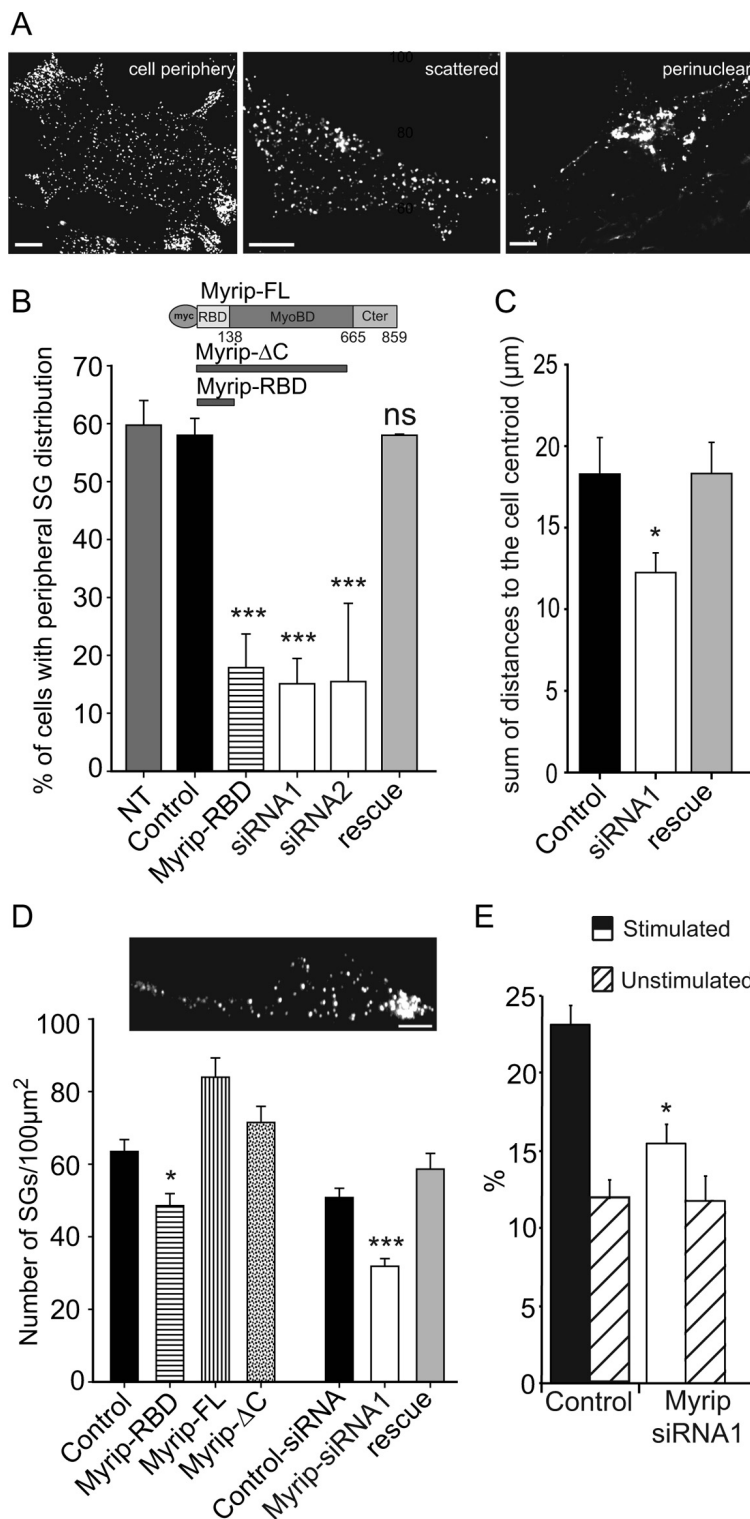


Figure 2. Myrip controls the distribution of SGs and their recruitment at the cell periphery. **A**, BON cells were transfected with siRNA duplexes or myc-tagged Myrip constructs, and intracellular distribution of SGs was analyzed 3 d later. SGs were stained using an anti-chromogranin A/B antibody or by means of NPY-GFP expression. SGs are generally enriched at the cell periphery and in cellular extensions (left). However, upon Myrip silencing or Myrip-RBD expression, SGs are frequently scattered in the cell (middle) or concentrated in the perinuclear region (right). **B**, Shown are the mean (\pm SE) percentages of cells with a marked enrichment of SGs at the cell periphery observed in control conditions (NT, nontransfected cells; $n = 139$ cells from 4 independent experiments; control, $n = 255$ cells from 6 experiments), upon expression of Myrip-RBD ($n = 109$ cells from 4 experiments), and upon transfection of Myrip-siRNA1 ($n = 190$ cells from 6 experiments), Myrip-siRNA2 ($n = 125$ cells from 3 experiments), and Myrip-siRNA1 plus a myc-tagged siRNA1-insensitive Myrip construct (rescue; $n = 81$ cells from 2 experiments). Inset, schematic representation of the Myrip constructs used in this study. $p < 0.0001$ (ANOVA); $***p < 0.001$ (Tukey's post-test); ns, nonsignificant. **C**, To quantify the cellular distribution of SGs, epifluorescence images of NPY-GFP-expressing cells were segmented using MIA software. For each cell, the mean distance of the thresholded pixels to the centroid of the cell footprint was computed. The

graph shows the mean (\pm SE) of the values obtained in 10 cells for each condition. $p = 0.0388$ (ANOVA). **D**, Myrip controls the juxtamembrane SG density. BON cells were transfected with an empty vector (Control, 39 cells from 2 experiments) or a control siRNA duplex (Control-siRNA, 107 cells from 7 experiments), with vectors encoding Myrip-RBD (42 cells from 2 experiments), Myrip-FL (38 cells from 2 experiments), Myrip- Δ C (38 cells from 2 experiments), or with Myrip-siRNA1 (96 cells from 7 experiments) and a Myrip rescue construct (20 cells from 2 experiments); they were also cotransfected with pNPY-mRFP to label SGs. Cells were imaged by TIRFM. Inset, A representative TIRFM image of a BON cell expressing NPY-mRFP. Data are expressed as the mean \pm SE of values obtained in the different cells; $p < 0.0001$ (Kruskal–Wallis). **E**, Effect of Myrip silencing on secretion. BON cells were treated with control siRNAs or with Myrip-targeting siRNAs. Three days later, they were loaded with [3 H]serotonin, washed, and stimulated with Locke's solution supplemented with 3.7 mM Ba $^{2+}$ (black and white bars) for 10 min or incubated in nonstimulating bathing medium for the same duration (dashed bars). Released serotonin was measured in the extracellular medium and expressed as a percentage of serotonin contained in the cells (mean \pm SE of 6–15 wells). Scale bars: 5 μ m. $*p < 0.05$; $***p < 0.001$.

the PM while keeping them at the cell periphery. An increased photobleaching of SGs could also account for the higher fluorescence loss observed upon expression of Myrip- Δ C. SGs would bleach faster if they were closer to the PM and therefore exposed to a greater flux of photons. However, this possibility seems unlikely because the initial fluorescence intensity of individual SGs was not modified by Myrip- Δ C expression, as would be the case if their distance to the PM was lower (data not shown). Using TIRF imaging, we also counted the number of NPY-GFP-labeled SGs that entered or left the evanescent field during time series of TIRF images (Fig. 5A). We observed that knocking down Myrip (Fig. 5B) increased both the rates of SG appearance and disappearance. MyoVa silencing induced similar, but less pronounced, effects (Fig. 5C). The increased rate of SG appearance may result from the higher density of SGs in the cell center observed in Myrip knockdown cells. In contrast, the increased rate of SG disappearance cannot be accounted for by changes in the number of SGs participating in the trafficking, but rather reflects an increase in the rate constant that controls the movement of SGs from the actin-rich layer to the cell center (see the Discussion section for a discussion of these data within the framework of the model depicted in Fig. 10; for the quantification of the different kinetic parameters, see Table 1).

←

Myrip silencing interferes with SG motion along microtubules

To determine how Myrip controls the retention of SGs at the cell periphery, we characterized SG mobility in the subplasmalemmal region by TIRF imaging and single-particle tracking. The mean lateral diffusion coefficient (D_{xy}), an index of the mobility of SGs, on entire trajectories was significantly higher in Myrip-silenced cells ($D_{xy} = 92.3 \pm 7.2 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; mean \pm SE; 653 SGs from 10 cells) than in control cells ($D_{xy} = 24.3 \pm 5.2 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; mean \pm SE; 761 SGs from 10 cells; $p = 0.007$). The distribution of mean D_{xy} values computed on entire trajectories is shown in Figure 6A and indicates two major effects of Myrip silencing: (1) an increased proportion of SGs with a very high D_{xy} value ($>50 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) and (2) a 50% reduction in the percentage of almost-immobile SGs ($D_{xy} < 5 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$).

To further characterize the effect of Myrip on fast-moving SGs, we manually selected subtrajectories characterized by fast ($D_{xy} > 50 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) and directed motion. Such trajectories are severely reduced upon nocodazole treatment, indicating that they correspond to SGs moving along microtubules (Desnos et al., 2007b). The proportion of time spent in a directed motion was increased from $3.8 \pm 0.4\%$ in control cells to $11.5 \pm 1.5\%$ in Myrip knockdown cells (mean \pm SE; $p = 0.002$). During these periods, SG velocity was $0.39 \pm 0.02 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ in control cells and $0.63 \pm 0.03 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ in Myrip-silenced cells (mean \pm SE; $p = 0.0002$), and the distribution of velocity values was shifted to higher values by Myrip silencing (Fig. 6B). In addition, the length of microtubule-based runs was increased in Myrip knockdown cells ($1.49 \pm 0.11 \mu\text{m}$) compared to control ones ($1.15 \pm 0.06 \mu\text{m}$; $p = 0.04$).

Myrip promotes SG attachment to the plasma membrane

Next, we focused on stalled SGs. While diffusing with an average D_{xy} equal to $25 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ in control conditions, SGs frequently display periods of highly restricted mobility with D_{xy} values as low as $10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Several authors have suggested that these stalling periods correspond to the attachment of SGs to the PM (Huet et al., 2006; Desnos et al., 2007b; Nofal et al., 2007; Karatekin et al., 2008; Yizhar and Ashery, 2008; Ostrowski et al., 2010). Before analyzing the consequences of impairing Myrip on this class of SG motion, we first investigated further whether transient stalling could be used as a criterion of attachment to the PM. The fluctuations in SG mobility were monitored by measuring the variations of D_{xy} along the SG trajectories, using a rolling analysis window, and immobilization periods were defined as portions of trajectories during which the D_{xy} value dropped below a threshold of $D_{min} = 5 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Fig. 7A,B). The choice of this threshold was driven by the observation that, within

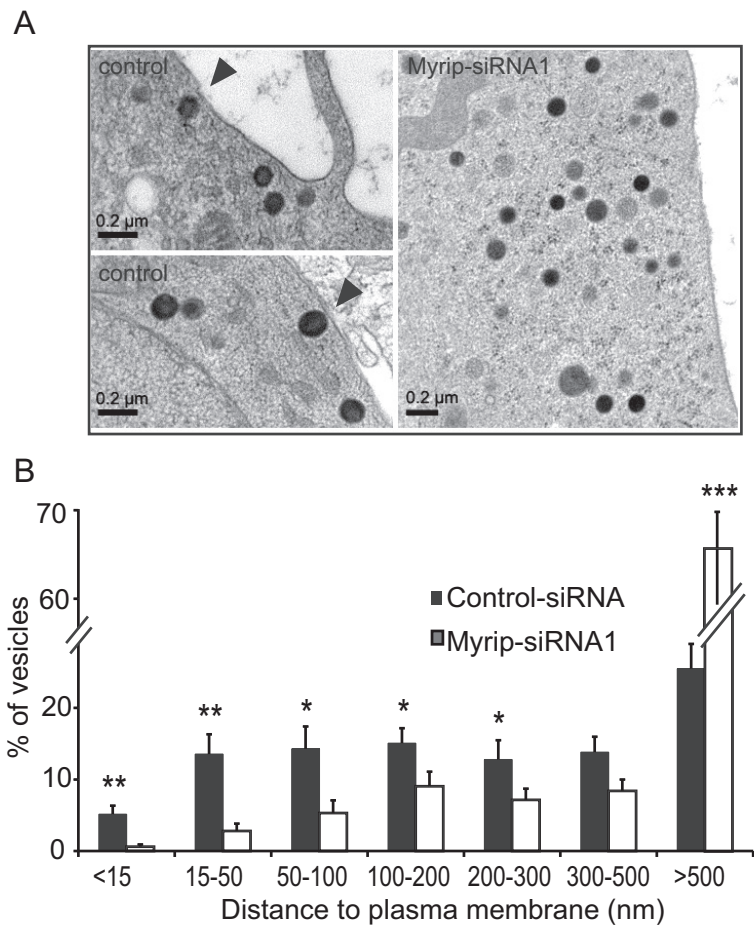


Figure 3. Ultrastructural localization of SGs in BON cells. **A**, Ultrathin cryosections of BON cells. BON cells were treated with control siRNAs or with Myrip siRNAs as indicated, frozen under high pressure to protect the cytoarchitecture, and processed for electron microscopy. Arrowheads indicate SGs close to the plasma membrane. **B**, Myrip silencing changed the localization of SGs. Distribution of the values of the distance between SGs and the PM expressed as percentage of the total number of SGs detected in each picture ($n = 30$ images). The data show that Myrip silencing reduced the number of SGs close to the PM (<15 nm or located between 15 and 50 nm) and increased the number of remote SGs (>500 nm). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

the 2 s preceding exocytosis, most of the SGs, which are probably attached to the PM, display a D_{xy} value of $<5 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Desnos et al., 2007b). However, due to the stochastic nature of Brownian motion, even purely diffusive trajectories characterized by an average diffusion coefficient of $10^{-3} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ may exhibit short periods during which D_{xy} is lower than D_{min} . To distinguish such false positive stalling events from real periods of SG attachment, it was thus necessary to set a minimum crossing time, t_{min} . Therefore, we compared the distribution of immobilization times between SG tracks and simulated Brownian trajectories. The survival curves displayed on Figure 7C show that with t_{min} set to 5 s, false positive stalling events were contributing by $<1\%$ to the events detected for SGs. Stalling periods were also detected on trajectories of latex beads diffusing in a glycerol/water mix, and we confirmed that, with this minimum crossing time, the probability of detecting stalling events was at least 100 times higher for SGs than for beads (Fig. 7C). To further substantiate the fact that stalling periods reflect a constrained behavior, we compared the anomaly of the diffusion between stalling periods longer than 5 s and the rest of SG trajectories. The anomaly parameter α quantifies the restriction of the diffusion: the lower the value of α , the more restricted the diffusion, with α ranging between 0 and 1. The stalling periods were characterized by a strong restriction of SG motion, with $\alpha \approx 0.4$, in agreement with

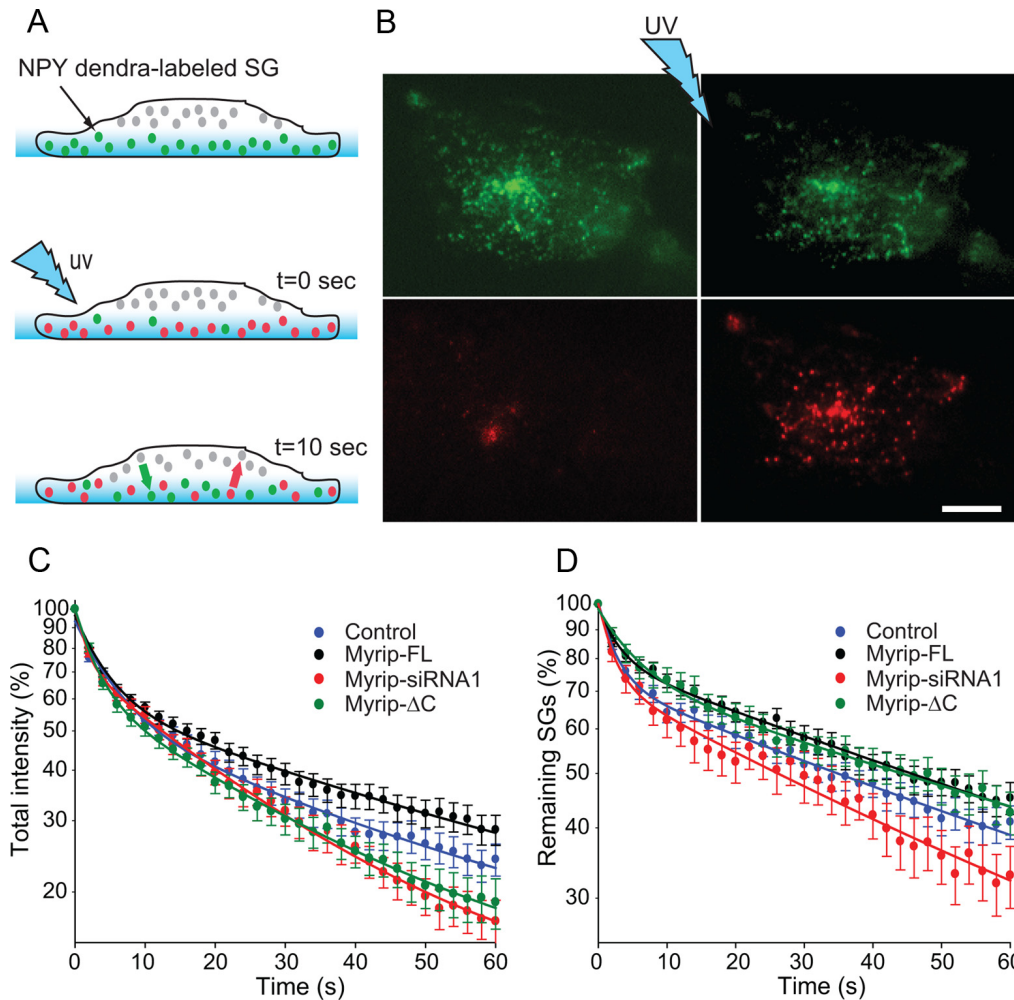


Figure 4. Myrip promotes the retention of SGs at the cell periphery. **A**, Principle of the experiment. Photoconversion of NPY-Dendra2 was used to label the subset of SGs that were close to the PM at time 0 (when a 2 s pulse of 405 nm light was delivered via the evanescent field) and to follow their dynamics over time. The signal is expected to decrease as photoconverted SGs leave the evanescent field area and are replaced by nonconverted ones. **B**, Photoconversion of NPY-Dendra2-labeled SGs. TIRF images of a cell in the green and red channels before (left) and after (right) a pulse of 405 nm light are shown. Scale bar, 5 μm . **C**, Fluorescence decay depends on Myrip. Plotted is the mean (\pm SE) integrated intensity per 100 μm^2 of the red fluorescence over time expressed as a percentage of the value measured just after photoconversion (time 0; $n = 47$ control cells, 16 Myrip knockdown cells, 57 cells overexpressing Myrip-FL, and 31 cells overexpressing Myrip- ΔC). **D**, The graph shows the number of red SGs counted on each frame and expressed as percentage of the initial value. The curves were fitted with the sum of two exponentials. The fit obtained for controls was significantly different from that obtained for Myrip-FL ($p = 0.0039$; extra sum of squares F test), Myrip knockdown ($p < 0.0001$), and Myrip- ΔC ($p < 0.0001$).

an attachment to the PM. In contrast, outside these stalling periods, SG diffusion showed only moderate restriction with $\alpha \approx 0.8$ (Fig. 7D). Finally, using the fact that, by TIRF microscopy, changes in SG fluorescence intensity report changes in the position along the vertical axis, we measured the difference in the altitude of SGs between two successive periods of immobilization. We found that, in most of the cases, the difference was < 20 nm (i.e., the resolution of our microscope in the z -axis) (Fig. 7E). The data thus suggest that immobile SGs are at the same altitude, i.e., at the PM. Survival curves for SG immobilization times were best fitted with two exponentials (Fig. 7C). It is noteworthy that both the short-lasting (characteristic time, ~ 4 s) and the long-lasting (characteristic time, ~ 15 s) components were observed in single cells and thus cannot be attributed to the heterogeneity of the population of cells (Fig. 7C). If slow diffusion can contribute a significant fraction of the fast component of the survival curves, it is not the case of the slow component, which we therefore used as a refined criterion of SG attachment to the PM.

We reported previously that MyoVa promotes SG attachment to the PM (Desnos et al., 2007b), an effect that could be due to an increase in either the occurrence or the duration of attachment

events. To resolve this issue, we analyzed the effect of MyoVa silencing on the distribution of immobilization times. MyoVa depletion reduced the occurrence of the long-lasting component but not its characteristic time τ_2 (Fig. 7G, I, J). This reduction in the occurrence of SG immobilization was observed with three different MyoVa siRNAs, indicating that it was not due to off-target effects. We conclude that MyoVa promotes the recruitment of SGs to the PM rather than the stability of the immobilized state.

Similarly, Myrip silencing reduced the occurrence of the long-lasting component (Fig. 7H, K). In addition, it reduced the characteristic time, τ_2 , of this immobilization process (Fig. 7H, L). It is noteworthy that survival curves were rescued by expressing a siRNA-insensitive Myrip construct arguing against an off-target effect of the siRNAs. Since Myrip silencing also reduced the number of SGs present in the TIRF area (Fig. 2D), its overall effect was to diminish the number of attached SGs per surface area by $\sim 65\%$. This conclusion is consistent with the data obtained by EM showing a severe reduction in the number of SGs morphologically attached to the PM in Myrip knockdown cells and accounts for the secretory defects observed in these cells.

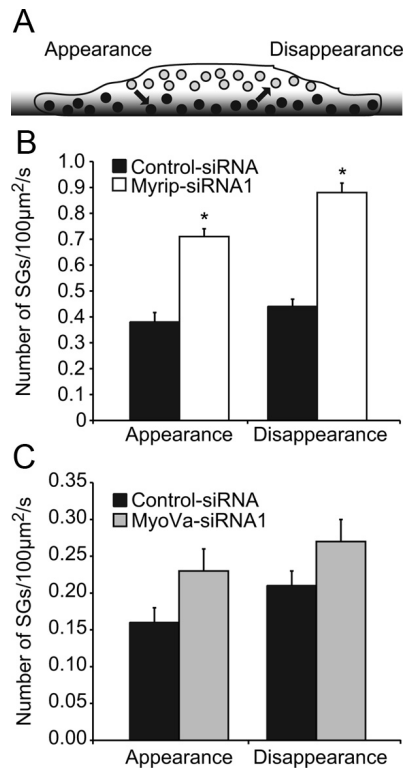


Figure 5. Effect of Myrip and MyoVa on the delivery of SGs at the cell periphery. **A**, Principle of the experiment. NPY-labeled SGs were imaged by TIRFM. Their appearance in the TIRF area and their disappearance were manually monitored along time-series images. **B**, Quantification of the Myrip data. Myrip silencing increased the occurrence of SG arrival at the cell periphery and also the disappearance of SGs. The increase in SG appearance does not imply that Myrip silencing promotes SG delivery at the cell periphery (i.e., an increase in k_1 ; see model in Fig. 10), but rather reflects the increase in the density of SGs in the cell center (we actually see an increase in k_1). * $p < 0.05$; Mann–Whitney test; $n = 10$ cells from 2 independent experiments. **C**, Quantification of the MyoVa data (same as in **B**, but for MyoVa silencing; $n = 20$ cells from two independent experiments). The effect of MyoVa knockdown is not as strong as that of Myrip knockdown ($p = 0.07$).

Myrip restricts the diffusion of SGs within the actin-rich cortex

Next, we characterized the effect of Myrip on the mobility of SGs when they were neither stalled nor moving along microtubules (see Materials and Methods). During such periods, SGs display Brownian motion and are therefore diffusing with or within the actin-rich cortex (Fig. 7D) (Huet et al., 2006). Both Myrip and MyoVa silencing increased the proportion of time spent by SGs in the diffusive state (Fig. 8A) and the mobility of SGs in the diffusive state (Myrip knockdown cells, $D_{xy} = 22.6 \pm 1.3 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ vs control, $14.9 \pm 1.9 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; 10 cells, $p = 0.01$; MyoVa-silenced cells, $D_{xy} = 24.5 \pm 2.9 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ vs control, $14.0 \pm 1.5 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; 16 cells, $p = 0.003$). These results suggest that the Rab27/Myrip/myosin Va complex restricts the mobility of SGs within the actin-rich cell cortex, most likely by tethering SGs to actin filaments, to maintain SGs in the vicinity of release sites.

The C-terminal domain of Myrip participates in SG attachment to the plasma membrane

The above-mentioned difference between the effects of Myrip and MyoVa silencing on the duration of long-lasting SG immobilization suggested that Myrip may exert MyoVa-independent actions. To investigate this possibility, we overexpressed Myrip, Myrip- Δ C (which can interact with MyoVa), or Myrip-RBD

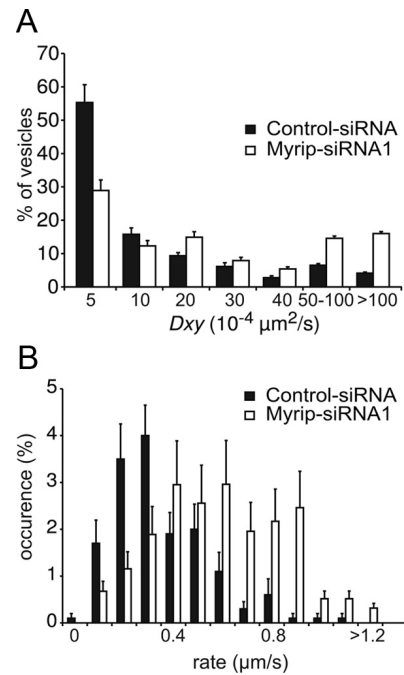


Figure 6. Myrip silencing changes the mobility of SGs. Single SGs were imaged by TIRFM under resting conditions and tracked in BON cells transfected with siRNA duplexes (control, black bars; Myrip siRNA, white bars) and pNPY-GFP. **A**, Shown is the distribution of D_{xy} values computed on entire trajectories ($n = 10$ cells from 2 independent experiments; control, 761 SGs; Myrip-siRNA1, 653 SGs). Myrip silencing significantly reduced the percentage of SGs with $D_{xy} < 5 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ that are likely attached to the PM and increased the proportion of SGs with $D_{xy} > 50 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ that are likely moving along microtubules. **B**, Myrip silencing increases SG velocity on microtubules. Subtrajectories corresponding to directed motion (i.e., along microtubules) were selected. Shown is the distribution of SG velocities in control cells (filled bars; 10 cells, 155 periods of directed motion) or in Myrip knockdown cells (open bars; 10 cells, 250 periods of directed motion). The distribution is shifted to the right upon Myrip silencing.

(which does not bind to MyoVa) into BON cells and measured its effect on SG mobility. Overexpression of Myrip-RBD or Myrip- Δ C increased the mean diffusion coefficient, D_{xy} , computed on entire trajectories (Fig. 9A) and reduced the percentage of SGs with very low D_{xy} values ($< 5 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) by $\sim 35\%$ compared to control cells or to cells expressing Myrip-FL ($p < 0.0001$, ANOVA). We then measured the duration of immobilization events along trajectories and found that Myrip-RBD and Myrip- Δ C reduced the occurrence of long-lasting immobilization periods by 53 and 27%, respectively. Myrip- Δ C also decreased the characteristic time of long-lasting immobilization compared to Myrip-FL (Fig. 9B) ($p = 0.0004$), suggesting that the C-terminal region of Myrip contributes to the stability of SG attachment at the plasma membrane.

Discussion

In this study, we identified Myrip as a factor that couples the capture of SGs in the actin-rich cell cortex and their attachment to the PM, a process mandatory for exocytosis. Myrip thus plays a major role in the accumulation of SGs at the cell periphery and in the replenishment of the releasable pool of SGs.

Inferring the functional state of SGs from their mobility

To understand SG recruitment at release sites, our approach was to track single SGs, to analyze their motion along trajectories and to infer their functional state from their behavior. Previous studies have shown the existence of three classes of SG motion and

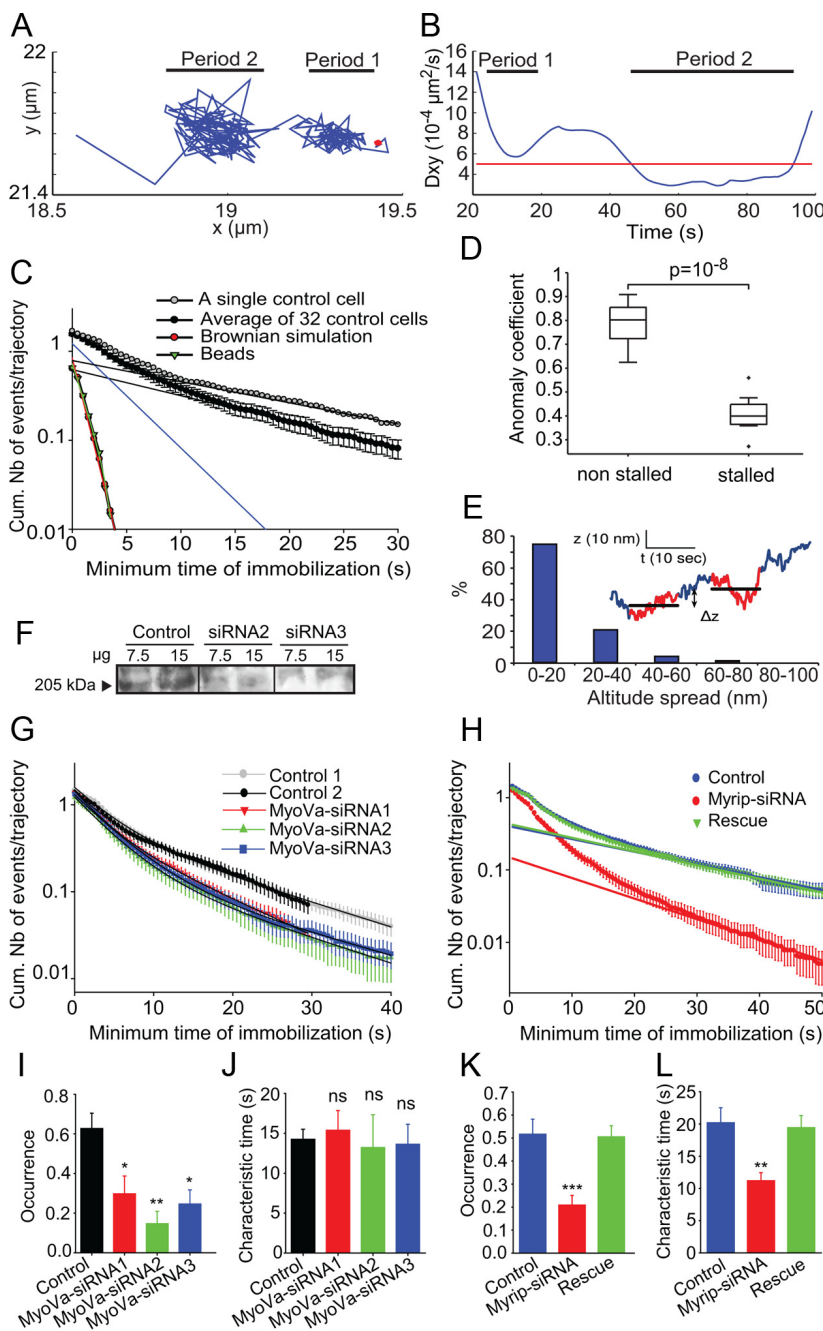


Figure 7. Myrip promotes SG attachment to the plasma membrane. **A, B**, Example of a single SG trajectory and detection of immobilization periods. The x – y displacement of a single SG is shown in **A**. The initial point of the trajectory is depicted by a red dot. The D_{xy} values were computed along the trajectory using a rolling analysis window and plotted against time in **B**. Below a threshold value $D_{min} = 5 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (red line), SGs were considered immobile. In this example, the SG displayed a constrained behavior during two subtrajectories. Period 2 was categorized as an immobilization period. **C**, The cumulative distribution of the number of immobilization events identified in control trajectories (filled circles, 32 cells) is plotted as a function of the minimum duration of immobilization. The best fit was obtained with the sum of two exponentials, indicating the existence of two different processes (black line, slow component; blue line, fast component). A similar distribution is found in single cells; an example is shown in gray. Ninety-nine percent of the immobilization periods detected in simulated Brownian trajectories (red) and fluorescent bead trajectories (green) were shorter than 5 s, and their distribution can be fitted by a single exponential. **D**, Box plot of the anomaly coefficient, which reports the restriction of SG diffusion. The coefficient has a value of 1 in purely diffusive trajectories. Five hundred and eighteen stalled periods (longer than 5 s) and 396 nonstalled periods from 10 cells were analyzed. **E**, The trace shows the motion of a single SG along the z -axis. Sections of the trajectory depicted in red correspond to periods of immobilization in the x – y plane. Horizontal bars report the mean altitude of the SG during these two periods. The histogram shows the distribution of the Δz values between successive immobilization periods, as measured in 114 trajectories from seven cells. **F**, Knockdown of MyoVa expression. Three days after transfection of siRNAs, MyoVa levels were analyzed by immunoblotting in cells treated with a control siRNA, MyoVa-siRNA2, or MyoVa-siRNA3. The result of a typical experiment is shown. For MyoVa-siRNA1 see the study by Desnos et al. (2007b). **G**, MyoVa silencing decreases the occurrence but not the duration of docking periods. BON cells were transfected with NPY-GFP and siRNAs targeting MyoVa and imaged by TIRFM ($n = 32$ control cells, 19 MyoVa-siRNA1 cells, 11 MyoVa-siRNA2

suggested that (1) rapid and asymmetric trajectories correspond to SGs moving along microtubules, (2) stalled SGs are attached to the PM, and (3) the remaining trajectories correspond to random walks within the actin-rich cell cortex (Huet et al., 2006; Desnos et al., 2007b).

One difficulty is to distinguish random walks from stalling periods. Here, we used a method that combined a selection of immobilization periods characterized by a low D_{xy} value with the analysis of their durations to provide an index of SG confinement. Analyzing the distribution of immobilization times helped to distinguish attachment (the long-lasting component of the survival curves) and slow random walk. Subtrajectories selected by D_{xy} thresholding and longer than 5 s were characterized by a nonlinear relationship between MSD and time, indicating a subdiffusive behavior. This is in agreement with our previous finding that these periods feature a negative autocorrelation of the motion along the z -axis, suggesting that during these periods, SGs do not move freely but are attached (Desnos et al., 2007b). SG immobilization could result from binding to other structures than the PM, especially to actin filaments. However, actin structures are not immobile (Desnos et al., 2007b) (our unpublished observations), and thus cannot support stable SG immobilization. Furthermore, we found that SGs that un-

cells, and 12 MyoVa-siRNA3 cells from 3 independent experiments with 1500–4000 trajectories per condition). Immobilization periods were detected as described in **B**. Shown is the logarithmic representation of the cumulative distribution of the number of immobilization events plotted as a function of their duration. The mean duration of trajectories was ~ 16 s in control cells and ~ 13 s in MyoVa knockdown cells. **H**, Myrip silencing decreases both the occurrence and the duration of docking periods (same as in **G** but for Myrip knockdown cells; $n = 32$ control cells, 30 Myrip-siRNA1 cells, and 20 rescue cells from 2–4 independent experiments, with 2500–3000 trajectories per condition). Note that both the intercept and the slope of the slow component of the distribution are affected by Myrip silencing. The mean duration of trajectories was ~ 18 s in control cells, ~ 12 s in Myrip knockdown cells, and ~ 16 s in rescue cells. **I–L**, The histograms show the values (mean \pm SE, calculated in each cell and averaged over the different cells) of the occurrence (i.e., the intercept of the fit curve with the y -axis) and the characteristic time of the slow component of the distribution of immobilization times; $p = 0.0006$ (MyoVa, occurrence), $p = 0.98$ (MyoVa, characteristic time), $p < 0.0001$ (Myrip, occurrence), and $p = 0.0017$ (Myrip, characteristic time; Kruskal–Wallis test). Asterisks indicate the results of a Dunn’s multiple comparison test. Similar values were obtained by fitting the averaged distribution of immobilization times shown in **G** and **H**. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

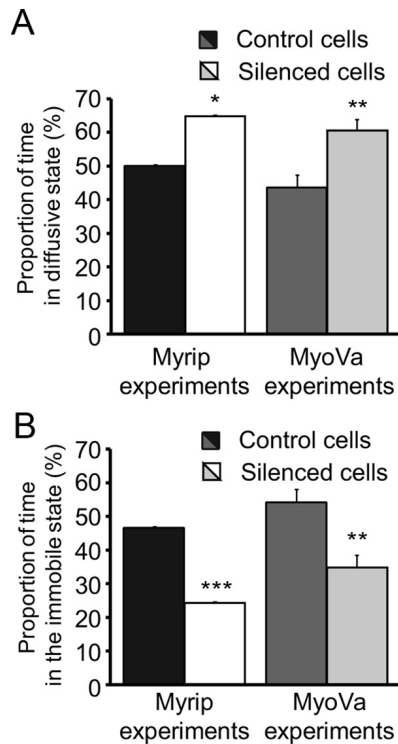


Figure 8. Effect of Myrip and MyoVa on the time spent in diffusive or immobile states. BON cells were transfected with siRNA duplexes (control, black; Myrip siRNA, white; MyoVa siRNA, gray) and pNPY-GFP and imaged by TIRFM. D_{xy} values were computed along single trajectories. Subtrajectories corresponding to directed movements (manually selected) or to stalled periods ($D_{xy} < 5 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ for $> 6-8.5$ s according to the conditions; see Materials and Methods) were identified. The remaining parts of the trajectories were considered diffusive. **A**, **B**, Proportion of time spent in the diffusive (**A**) or immobile (**B**) state for SGs from control, Myrip knockdown cells, and MyoVa knockdown cells (10–20 cells per condition). The mean length of trajectories was ≈ 17 s in control cells, 14 s in MyoVa knockdown cells, and 10 s in Myrip knockdown cells. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

dergo multiple immobilization periods during their trajectory generally immobilize at the same altitude. As actin filaments are present at different altitudes, this observation also suggests that SGs immobilize at the PM. We think that this approach provides a robust criterion of SG attachment to the PM.

SG mobility is high in BON cells compared to primary neuroendocrine cells such as adrenal chromaffin cells and pancreatic β cells (Degtyar et al., 2007; Michael et al., 2007). As we can collect many examples of the different possible behaviors and transitions between different classes of motion, this particular feature of BON cells facilitates the analysis of SG recruitment at exocytotic sites.

A compartment model to analyze Myrip-dependent SG trafficking

Our data indicate that Myrip has profound effects on SG distribution, mobility, and membrane attachment. To evaluate the different parameters controlling SG dynamics at the cell cortex, we designed a simple compartment model to describe SG delivery to the PM (Fig. 10A). The model posits that SGs are transported from the cell center (C) to the cell periphery (most likely along microtubules) and then enter a thin (~ 1 SG diameter) actin-rich layer (A) into which they diffuse until they find an attachment site at the PM (D). As suggested by Huet et al. (2006), we considered that the transition C \rightarrow D is not allowed, i.e., that SGs coming from the cell center cannot reach the PM directly. The values of A (0.22 ± 0.025 SGs/ μm^2) (Table 1) and D (0.22 ± 0.025 SGs/

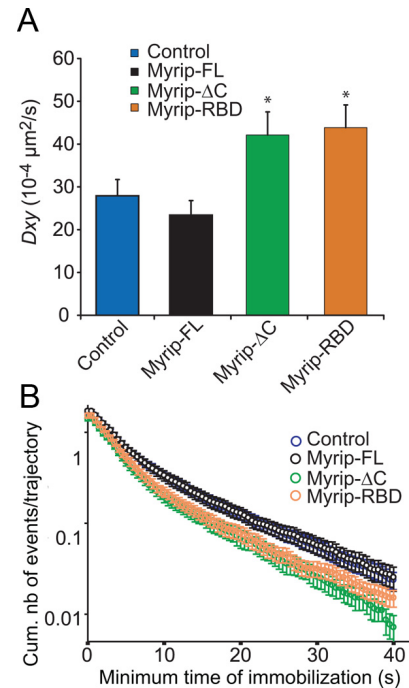


Figure 9. The C-terminal domain of Myrip plays a role in SG immobilization. **A**, Effect of Myrip constructs on overall SG mobility. BON cells were transfected with NPY-GFP and Myrip-RBD, Myrip-FL or Myrip- Δ C and imaged by TIRFM. SG trajectories were tracked, and D_{xy} values were computed on entire trajectories. Shown are the means (\pm SE) of the values obtained for 34 control cells (from 4 experiments) or 30 cells overexpressing Myrip constructs ($n = 3$ experiments). $p = 0.0011$ (Kruskal–Wallis test). **B**, Truncated Myrip constructs reduced long-lasting SG immobilization. A rolling window was used to calculate D_{xy} values along SG trajectories and to detect immobilization portions of trajectories with a D_{xy} value inferior to $5 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Shown is the logarithmic representation of the cumulative distribution of the number of immobilization events plotted as a function of their duration. The occurrence of the long-lasting component was lower in Myrip-RBD- and Myrip- Δ C-expressing cells than in control cells or Myrip-FL-expressing cells ($p < 0.0002$, extra sum of squares F test). The slope of this component was also higher in Myrip- Δ C- than in Myrip-FL-expressing cells ($p = 0.0004$). * $p < 0.05$.

μm^2) were derived from the density of SGs observed by TIRFM (density = A + D) and from the proportion of the time spent in the stalled or diffusive states, as deduced from the analysis of D_{xy} along trajectories (Figs. 7, 8). At steady state, the number of SGs arriving in the TIRF area should be similar to the number of SGs exiting the TIRF field; hence, $k_{-1}A = k_1C$. Consistently, SG appearance and disappearance rates were found to be similar (Fig. 5). From the rate of SG disappearance ($k_{-1}A$) and the measured value of A, we obtained $k_{-1} = 0.016 \pm 0.002 \text{ s}^{-1}$. Similarly, at steady state, the number of SGs diffusing in the cell cortex that immobilize at the PM is compensated by a similar number of SGs that come apart. Thus, $k_2A = k_{-2}D$. The detachment rate constant k_{-2} determines the characteristic lifetime, τ , of the immobilized state ($\tau = 1/k_{-2}$), which we inferred from the survival curves shown in Figure 7 (number of stalled SGs still immobilized after a time t). The exponential fit to the slow component of these curves gave a value for k_{-2} ($k_{-2} = 0.056 \pm 0.007 \text{ s}^{-1}$), and hence for k_2 , the rate constant of SG attachment to the PM [$k_2 = k_{-2}D/A = 0.082 \pm 0.012 \text{ s}^{-1}$].

Using this compartment model, we simulated the photoconversion experiment shown in Figure 4 (Fig. 10B). Both the experimental and simulated curves display a biphasic behavior which can be well fitted with the sum of two exponential components. The fast one (characteristic time, 6.5 s, compared with 5.9 s for the experimental curve) represents the equilibration of A and D

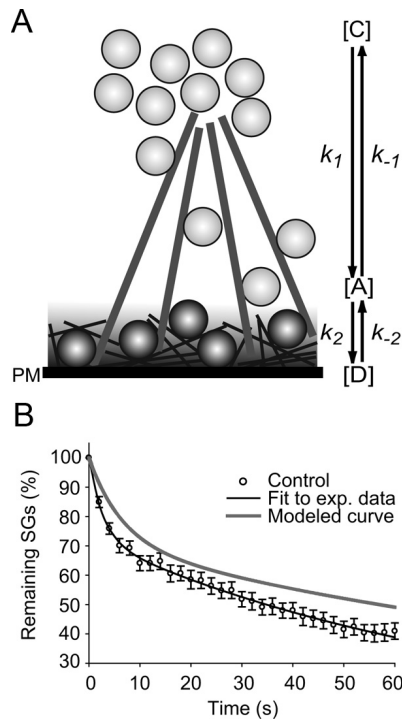


Figure 10. Model of SG delivery at the cell periphery. **A**, SGs may be attached to the PM (D) or located in the actin-rich juxtamembrane region (A) or in the cell center (C). Straight yellow lines represent microtubules along which SGs travel to reach or to leave the cell periphery. Thin lines represent the actin filament network. Transitions between the three states C, A, and D are governed by the constants k_1 , k_{-1} , k_2 , and k_{-2} . In agreement with previous findings (Huet et al., 2006), the transition between C and D is forbidden: SGs must dissociate from MTs and diffuse for a while within the actin cortex before they can attach at the PM. See Table 1 for a quantification of the rate constant values. Since the characteristic residency time at the cell periphery ($A + D$, ~ 60 s) is longer than the sum of the residency time in A (~ 15 s) and in D (~ 15 s), we conclude that SGs can undergo several local searches and successful membrane attachment periods before going back to C. **B**, Simulation of the photoconversion experiments. Shown is the comparison of the photoconversion experiment (control condition as in Fig. 5D, fitted with 2 exponentials; solid black line) and a simulation (gray) based on the model shown in **A** (for details, see Materials and Methods). The fast component reflects the equilibration between SGs attached to the PM and SGs diffusing in the actin-rich layer. The slow component represents the exit of SGs from the actin-rich layer.

pools, while the slow one (characteristic time, ~ 130 s, compared with ~ 75 s for the experimental curve) represents the exit of SGs from the actin-rich layer. Given the cell-to-cell dispersion of the experimental data and the fact that the simulations did not include any fitted parameter but rather used characteristics directly derived from independent experimental approaches, the simulations appear to follow reasonably well the experimental data, arguing for the validity of our compartment model.

The time spent by a SG in the actin-rich layer [$1/(k_2 + k_{-1})$] is about 10 s, similar to the time spent in the immobile state. From our photoactivation data, we also obtained the overall time spent in the juxtamembrane region, a value close to 60 s. Therefore, after microtubule-dependent delivery (long-range search), SGs perform an average of two successful local searches for an attachment site at the PM before leaving the juxtamembrane area.

The consequences of Myrip and MyoVa knockdown on SG dynamics at the cell cortex were analyzed using the same compartment model (Table 1). Myrip silencing induced a marked increase in k_{-1} and k_{-2} values and a decrease in k_2 values, indicating decreased retention in the actin-rich cell cortex, decreased transport toward attachment sites at the PM, and lowered stability of SG attachment. Lowering MyoVa levels induced a slight

Table 1. The dynamics of SGs quantified according to the model depicted in Figure 10

	Control SiRNA	MyoVa SiRNA1	Myrip SiRNA
Density (SG/ μm^2)	0.44 ± 0.038	$0.23 \pm 0.023^{**}$	0.35 ± 0.032
Docked (%)	50.7 ± 3.1	$35.6 \pm 3.7^{**}$	$24.4 \pm 2.4^{***}$
D (SG/ μm^2)	0.22 ± 0.025	$0.08 \pm 0.013^{***}$	$0.08 \pm 0.011^{**}$
A (SG/ μm^2)	0.22 ± 0.025	0.15 ± 0.016	0.26 ± 0.028
k_2 (s^{-1})	0.082 ± 0.012	$0.045 \pm 0.012^*$	$0.040 \pm 0.006^*$
k_{-2} (s^{-1})	0.056 ± 0.004	0.064 ± 0.01	$0.088 \pm 0.009^{***}$
k_{-1} (s^{-1})	0.016 ± 0.002	$0.022 \pm 0.002^{**}$	$0.036 \pm 0.005^{**}$
k_1C (SG/ $\mu\text{m}^2/\text{s}$)	0.0033 ± 0.001	0.0027 ± 0.0002	$0.0087 \pm 0.001^{**}$
N (cells)	22	12	10

SG density refers to the number of SGs detected by TIRFM. The density of SGs attached to the PM (D) or diffusing in the actin-rich layer (A) were derived from SG density and from the percentage of time spent in the stalled (immobile for more than 6–8.5 s; see Materials and Methods) or in the diffusive state (Figure 8). The undocking rate constant k_{-2} was derived from the exponential fit to the survival curves shown in Figure 7 (slow component of the curves). The rates of SG appearance (k_1C) and disappearance ($k_{-1}A$) from the TIRF area were measured as depicted in Figure 5. Since A is known, we could obtain k_{-1} . Finally, at the steady state, $k_2A = k_{-2}D$; we thus obtained a value for k_2 , the rate constant of SG attachment to the PM. Data are expressed as the mean \pm SE of values obtained in the different cells. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

increase in k_{-1} and a decrease in k_2 , but no significant change in the rate of SG detachment from the PM. Therefore, we conclude that the effects of Myrip can be partly accounted for by the recruitment of MyoVa and that Myrip also exerts a MyoVa-independent role in SG attachment to the PM. In addition, the effect of Myrip and MyoVa on k_2 suggest that the motor activity of MyoVa promotes the delivery of SGs at the PM, and therefore that MyoVa does not merely act as a tether.

Myrip and MyoVa mediate the retention of SGs at the cell periphery

Our observations demonstrate that Myrip and MyoVa mediate the retention of SGs at the cell periphery. Three mechanisms are likely involved. First, Myrip mediates the association of SGs with the actin-rich layer. This conclusion is supported by the increase in the rate constant k_{-1} and the increased mobility of the SGs that were diffusing within the actin-rich layer observed in Myrip knockdown cells. Both MyoVa (Desnos et al., 2007b) and Myrip may mediate the association of SGs with actin filaments. The C-terminal region of Myrip, which directly interacts with F-actin (Fukuda and Kuroda, 2002; Desnos et al., 2003), contributes to the restriction in SG mobility during diffusive periods (see Results) (Fig. 9), suggesting that Myrip directly tethers SGs to actin.

The second mechanism that contributes to SG retention at the cell periphery is suggested by the effect of Myrip on SG motion along microtubules. SGs move faster along MTs in the absence of Myrip (present study) or MyoVa (Desnos et al., 2007b), suggesting that powering SG motion along microtubules is made more difficult in the actin-rich environment by the interaction of Myrip or MyoVa with F-actin. This interaction may therefore promote the detachment of the newly arrived SGs from microtubules. This capture mechanism involving dissociation from microtubules and retention in the actin-rich layer is likely to have broad implications in the polarized distribution of various organelles, such as melanosomes, calcium stores, or recycling endosomes (Desnos et al., 2007a; Wagner et al., 2011).

The third mechanism underlying SG retention in the subplasmalemmal region is the attachment of SGs to the PM. The probability of SG attachment to the PM (the A-to-D transition in Figure 10) is decreased in both Myrip and MyoVa knockdown cells, indicating that the two proteins promote SG delivery to release sites. This effect is probably due to the motor activity of MyoVa directed toward the PM, where F-actin barbed ends are enriched. In addition, we observed a specific effect of Myrip de-

pletion on the stability of SG immobilization at the PM, indicating that Myrip, but not MyoVa, is a component of the attachment machinery. This effect is mediated by the C-terminal region of Myrip since overexpression of Myrip- Δ C but not of full-length Myrip reduced the stability of SG immobilization.

Mizuno et al. (2011) previously characterized the effect of Myrip on the trafficking and exocytosis of SGs in insulin-secreting cells. In agreement with previous studies (Waselle et al., 2003; Ivarsson et al., 2005) and this report, they found that Myrip silencing reduced insulin secretion and SG recruitment at the cell periphery. Based on the effect of Myrip overexpression on the accumulation of SGs in the actin-rich layer, they suggested that Myrip only acts by tethering SGs to the actin-rich layer, via MyoVa. However, this observation supports the conclusion that Myrip tethers SGs to actin filaments (Desnos et al., 2003; Kuroda and Fukuda, 2005) (present study), but does not contradict the proposed additional role of Myrip in SG docking at the PM.

A direct role for Myrip in SG attachment to the PM

The fact that Myrip silencing and Myrip- Δ C, but not MyoVa, modify the duration of immobilization events indicates that the C-terminal region of Myrip is involved in the attachment of SGs to the PM. This region of Myrip interacts with components of the exocyst (Goehring et al., 2007), a multimeric protein complex involved in tethering reactions between membrane compartments. The exocyst targets several transport vesicles to the PM (Lipschutz and Mostov, 2002; He and Guo, 2009), and preliminary evidence supports its role in SG docking (Tsuboi et al., 2005). The reported effect of the C-terminal region of Myrip on SG secretion and melanosome distribution (Waselle et al., 2003; Imai et al., 2004; Ramalho et al., 2009) may therefore be related to the Myrip/exocyst interaction. Future studies will have to test the possibility that the exocyst complex mediates the effect of Myrip on SG docking. The SNARE proteins SNAP25 and syntaxin-1, as well as the syntaxin-1 partner Munc18 and the vesicular protein synaptotagmin-1, have also been implicated in SG docking at the PM (Toonen et al., 2006; de Wit et al., 2009). A key issue is to determine the relationship among Myrip, the exocyst, and this SNARE-based docking complex. One possibility is that Myrip mediates the first interaction with the PM, in concert with the large exocyst complex, and that SNAREs and synaptotagmins then assemble to mediate short-range interactions between SGs and the PM and prime SGs for exocytosis. The fact that previously immobilized SGs undergo a 20 nm step toward the PM (Karatekin et al., 2008) or a small lateral movement (Degtyar et al., 2007) shortly before fusion supports this possibility and suggests that different-sized tethering complexes are sequentially formed during the secretory process (Karatekin et al., 2008).

References

- Chudakov DM, Lukyanov S, Lukyanov KA (2007) Tracking intracellular protein movements using photoswitchable fluorescent proteins PS-CFP2 and Dendra2. *Nat Protoc* 2:2024–2032.
- Darchen F, Desnos C (2012) Masterclass with Rab3 and Rab27: orchestrating regulated secretion. In: Rab GTPases and membrane trafficking (Guangpu Li, Nava Segev, eds). Oak Park, IL: Bentham Science.
- Degtyar VE, Allersma MW, Axelrod D, Holz RW (2007) Increased motion and travel, rather than stable docking, characterize the last moments before secretory granule fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15929–15934.
- 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 (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.
- Desnos C, Huet S, Darchen F (2007a) “Should I stay or should I go?": myosin V function in organelle trafficking. *Biol Cell* 99:411–423.
- Desnos C, Huet S, Fanget I, Chapuis C, Bottiger C, Racine V, Sibarita JB, Henry JP, Darchen F (2007b) Myosin Va mediates docking of secretory granules at the plasma membrane. *J Neurosci* 27:10636–10645.
- de Wit H, Walter AM, Milosevic I, Gulyas-Kovacs A, Riedel D, Sorensen JB, Verhage M (2009) Synaptotagmin-1 docks secretory vesicles to syntaxin-1/SNAP-25 receptor complexes. *Cell* 138:935–946.
- El-Amraoui A, Schonn JS, Kussel-Andermann P, Blanchard S, Desnos C, Henry JP, Wolfrum U, Darchen F, Petit C (2002) MyRIP, a novel Rab effector, enables myosin VIIa recruitment to retinal melanosomes. *EMBO Rep* 3:463–470.
- Espreafico EM, Cheney RE, Matteoli M, Nascimento AA, De Camilli PV, Larson RE, Mooseker MS (1992) Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J Cell Biol* 119:1541–1557.
- Evers BM, Townsend CM Jr, Upp JR, Allen E, Hurlbut SC, Kim SW, Rajaraman S, Singh P, Reubi JC, Thompson JC (1991) Establishment and characterization of a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth. *Gastroenterology* 101:303–311.
- Fukuda M, Kuroda TS (2002) Slac2-c (synaptotagmin-like protein homologue lacking C2 domains-c), a novel linker protein that interacts with Rab27, myosin Va/VIIa, and actin. *J Biol Chem* 277:43096–43103.
- Goehring AS, Pedroja BS, Hinke SA, Langeberg LK, Scott JD (2007) MyRIP anchors protein kinase A to the exocyst complex. *J Biol Chem* 282:33155–33167.
- He B, Guo W (2009) The exocyst complex in polarized exocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 21:537–542.
- Huet S, Karatekin E, Tran VS, Fanget I, Cribier S, Henry JP (2006) Analysis of transient behavior in complex trajectories: application to secretory vesicle dynamics. *Biophys J* 91:3542–3559.
- Imai A, Yoshie S, Nashida T, Shimomura H, Fukuda M (2004) The small GTPase Rab27B regulates amylase release from rat parotid acinar cells. *J Cell Sci* 117:1945–1953.
- Ivarsson R, Jing X, Waselle L, Regazzi R, Renstrom E (2005) Myosin 5a controls insulin granule recruitment during late-phase secretion. *Traffic* 6:1027–1035.
- Johns LM, Levitan ES, Shelden EA, Holz RW, Axelrod D (2001) Restriction of secretory granule motion near the plasma membrane of chromaffin cells. *J Cell Biol* 153:177–190.
- Karatekin E, Tran VS, Huet S, Fanget I, Cribier S, Henry JP (2008) A 20-nm step toward the cell membrane preceding exocytosis may correspond to docking of tethered granules. *Biophys J* 94:2891–2905.
- Kim M, Javed NH, Yu JG, Christofi F, Cooke HJ (2001) Mechanical stimulation activates G α q signaling pathways and 5-hydroxytryptamine release from human carcinoid BON cells. *J Clin Invest* 108:1051–1059.
- Klomp AE, Teofilo K, Legacki E, Williams DS (2007) Analysis of the linkage of MYRIP and MYO7A to melanosomes by RAB27A in retinal pigment epithelial cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 64:474–487.
- Kuroda TS, Fukuda M (2005) Functional analysis of Slac2-c/MyRIP as a linker protein between melanosomes and myosin VIIa. *J Biol Chem* 280:28015–28022.
- Lindsay AJ, McCaffrey MW (2011) Myosin Va is required for P body but not stress granule formation. *J Biol Chem* 286:11519–11528.
- Lipschutz JH, Mostov KE (2002) Exocytosis: the many masters of the exocyst. *Curr Biol* 12:R212–R214.
- Lopes VS, Ramalho JS, Owen DM, Karl MO, Strauss O, Futter CE, Seabra MC (2007) The ternary Rab27a-Myrip-Myosin VIIa complex regulates melanosome motility in the retinal pigment epithelium. *Traffic* 8:486–499.
- Malacombe M, Bader MF, Gasman S (2006) Exocytosis in neuroendocrine cells: new tasks for actin. *Biochim Biophys Acta* 1763:1175–1183.
- Michael DJ, Xiong W, Geng X, Drain P, Chow RH (2007) Human insulin vesicle dynamics during pulsatile secretion. *Diabetes* 56:1277–1288.
- Mizuno K, Ramalho JS, Izumi T (2011) Exophilin8 transiently clusters insulin granules at the actin-rich cell cortex prior to exocytosis. *Mol Biol Cell* 22:1716–1726.
- Nofal S, Becherer U, Hof D, Matti U, Rettig J (2007) Primed vesicles can be distinguished from docked vesicles by analyzing their mobility. *J Neurosci* 27:1386–1395.
- Oheim M, Stuhmer W (2000) Tracking chromaffin granules on their way through the actin cortex. *Eur Biophys J* 29:67–89.
- Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, Moita

- CF, Schauer K, Hume AN, Freitas RP, Goud B, Benaroch P, Hacohen N, Fukuda M, Desnos C, Seabra MC, Darchen F, Amigorena S, Moita LF, Thery C (2010) Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol* 12:19–30.
- Racine V, Hertzog A, Jouanneau J, Salamero J, Kervrann C, Sibarita JB (2006) Multiple-target tracking of 3D fluorescent objects based on simulated annealing. Third IEEE International Symposium on Biomedical Imaging. pp 1020–1023. doi:10.1109/ISBI.2006.1625094.
- Ramalho JS, Lopes VS, Tarafder AK, Seabra MC, Hume AN (2009) Myrip uses distinct domains in the cellular activation of myosin VA and myosin VIIA in melanosome transport. *Pigment Cell Melanoma Res* 22:461–473.
- Rose SD, Lejen T, Casaletti L, Larson RE, Pene TD, Trifaro JM (2003) Myosins II and V in chromaffin cells: myosin V is a chromaffin vesicle molecular motor involved in secretion. *J Neurochem* 85:287–298.
- Rudolf R, Salm T, Rustom A, Gerdes HH (2001) Dynamics of immature secretory granules: role of cytoskeletal elements during transport, cortical restriction, and F-actin-dependent tethering. *Mol Biol Cell* 12:1353–1365.
- Rudolf R, Kogel T, Kuznetsov SA, Salm T, Schlicker O, Hellwig A, Hammer JA III, Gerdes HH (2003) Myosin Va facilitates the distribution of secretory granules in the F-actin rich cortex of PC12 cells. *J Cell Sci* 116:1339–1348.
- Rudolf R, Bittins CM, Gerdes HH (2011) The role of myosin V in exocytosis and synaptic plasticity. *J Neurochem* 116:177–191.
- Seabra MC, Coudrier E (2004) Rab GTPases and myosin motors in organelle motility. *Traffic* 5:393–399.
- Siksoo L, Rostaing P, Lechaire JP, Boudier T, Ohtsuka T, Fejtova A, Kao HT, Greengard P, Gundelfinger ED, Triller A, Marty S (2007) Three-dimensional architecture of presynaptic terminal cytomatrix. *J Neurosci* 27:6868–6877.
- Toonen RF, Kochubey O, de Wit H, Gulyas-Kovacs A, Konijnenburg B, Sorensen JB, Klingauf J, Verhage M (2006) Dissecting docking and tethering of secretory vesicles at the target membrane. *EMBO J* 25:3725–3737.
- Tsuboi T, Ravier MA, Xie H, Ewart MA, Gould GW, Baldwin SA, Rutter GA (2005) Mammalian exocyst complex is required for the docking step of insulin vesicle exocytosis. *J Biol Chem* 280:25565–25570.
- Varadi A, Tsuboi T, Rutter GA (2005) Myosin Va transports dense core secretory vesicles in pancreatic MIN6 beta-cells. *Mol Biol Cell* 16:2670–2680.
- Verhage M, Sorensen JB (2008) Vesicle docking in regulated exocytosis. *Traffic* 9:1414–1424.
- Wagner W, Brenowitz SD, Hammer JA, 3rd (2011) Myosin-Va transports the endoplasmic reticulum into the dendritic spines of Purkinje neurons. *Nat Cell Biol* 13:40–48.
- Waselle L, Coppola T, Fukuda M, Iezzi M, El-Amraoui A, Petit C, Regazzi R (2003) Involvement of the Rab27 binding protein Slac2c/MyRIP in insulin exocytosis. *Mol Biol Cell* 14:4103–4113.
- Yizhar O, Ashery U (2008) Modulating vesicle priming reveals that vesicle immobilization is necessary but not sufficient for fusion-competence. *PLoS One* 3:e2694.

Coupling Amperometry and Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy at ITO Surfaces for Monitoring Exocytosis of Single Vesicles**

Anne Meunier, Ouardane Jouannot, Rémy Fulcrand, Isabelle Fanget, Marine Bretou, Erdem Karatekin, Stéphane Arbault, Manon Guille, François Darchen, Frédéric Lemaître, and Christian Amatore*

Water-soluble hormones and neurotransmitters are packaged in secretory vesicles and secreted into the extracellular medium by exocytosis, a process involving the fusion of the vesicle membrane with the cell membrane.^[1] Transport of the secretory vesicles to the cell's periphery, the maturation stages they undergo there to acquire fusion competence, and the factors controlling the fusion process itself (including the dynamics of the fusion pore) are important biological questions that are not fully understood.

To elucidate secretory mechanisms at the single-vesicle level, currently only a few analytical methods exist, which can be grouped into electrical or optical recordings.^[2] The great advantage of electrical recordings (patch-clamp membrane capacitance and electrochemical amperometry) is their excellent time resolution (ca. tens of microseconds), which allows studies of the dynamics of the fusion pore itself. However, a major disadvantage is the fact that signals appear only after fusion has commenced; that is, the dynamics of the secretory vesicle itself or any labeled regulatory protein prior to the fusion event cannot be detected. In contrast, optical recordings allow secretory vesicles or regulatory proteins to be visualized and tracked prior to their fusion, yet generally they lack the time resolution required to follow the dynamics of

the fusion pore (typical time resolution is ca. 100 ms). In addition, depending on the technique, secretion may be probed from different areas of a cell (top or bottom), which makes comparison of the results obtained by different approaches difficult.

Because of their complementary nature, it would be a great advance if electrical and optical measurements could be made simultaneously from the same side of a cell at the single-vesicle level. This will enable a comprehensive and precise analysis of the whole exocytotic event, from predocking through fusion steps up to the dynamics of vesicular release. Herein, we report a device based on transparent indium tin oxide (ITO) electrodes, which allows simultaneous total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) and amperometric measurements (Figure 1). As a proof of concept, the ability of our device in the coupled optical and electrochemical detections of exocytotic events is demonstrated using enterochromaffin BON cells.

Amperometry is based on detection at a microelectrode surface positioned near the emitting cell of electroactive vesicular contents that are released into the extracellular medium.^[3,4] With very high temporal resolution and sensitivity, the flux of the vesicular content (released through an initial fusion pore that is only a few nanometers wide) corresponding to an exocytotic event appears as a current spike, which features (frequency, time length, area, magnitude) the dynamics of release from single vesicles. Generally, amperometry involves placing a large collecting electrode near the investigated cell. The whole cell active surface area is covered so the spatial localization of a particular exocytotic event cannot be achieved. Nevertheless, a few studies involving smaller microelectrodes^[5] or microelectrode arrays^[6,7] allowed amperometric signals from different releasing sites to be identified, but with a random positioning for the small microelectrode and a spatial resolution necessarily limited by the array dimensions, respectively. Coupling of amperometric and optical recordings would allow precise localization of exocytosis events in space and time.

The most widely used optical approach to study exocytosis, TIRFM, is based on the total internal reflection of a laser beam at the glass/water interface, which creates an evanescent field in the aqueous medium whose characteristic decay length (ca. 100 nm) provides a high signal-to-noise ratio and an axial resolution of about 10 nm.^[8,9] When a vesicle fuses with the plasma membrane, its labeled contents are released toward the glass/water interface where the excitation

[*] A. Meunier, Dr. R. Fulcrand, Dr. S. Arbault,^[†] Dr. M. Guille, Dr. F. Lemaître, Prof. C. Amatore
Département de Chimie, Ecole Normale Supérieure UMR 8640
(CNRS-ENS-UPMC Univ Paris 06)
24 rue Lhomond, 75005 Paris (France)
Fax: (+33) 1-4432-3863
E-mail: Christian.Amatore@ens.fr

O. Jouannot, Dr. I. Fanget, Dr. M. Bretou, Dr. E. Karatekin,
Dr. F. Darchen
CNRS/Université Paris Descartes UMR8192
45 rue des Saints-Pères, 75270 Paris cedex 06 (France)

[†] Present address: Groupe Nanosystèmes Analytiques, Institut des Sciences Moléculaires UMR 5255, Université de Bordeaux (France)

[**] This work was supported in part by the CNRS (UMR 8640, FR2702, LIAXiamENS), Ecole Normale Supérieure, French Ministry of Research, ANR (μPHYSCEMBIO), Université Pierre & Marie Curie Paris 06, and by the European Commission under the Seventh Framework Programme (Nanoscale CP-FP 214566-2). ITO = indium tin oxide.

Supporting information for this article (details of ITO device fabrication, experimental information on the amperometric and optical detections, and the preparation and stimulation of BON cells) is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201101148>.

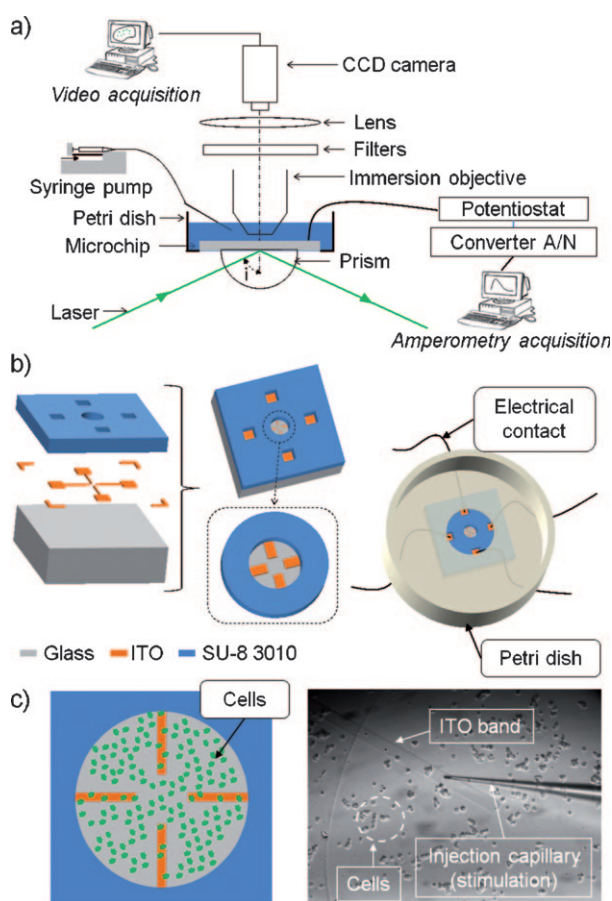


Figure 1. a) Setup required for TIRFM–amperometry coupling. b) Schematic representation of the device with four ITO bands used for the combined detections. c) Left: scheme of cells adhered on the device. Right: inverted microscopy image of BC21 BON cells adhering to the well containing the ITO microelectrodes. Only a portion of the well (one band) is shown for clarity.

field is stronger. Because the fluorescent probe is typically pH dependent, the signal transiently brightens during release and then disappears as the fluorophores diffuse away, that is, single exocytotic events are visualized as “puffs” of light which accompany the disappearance of fluorescent spots.^[10–12]

Combining TIRFM and amperometric detection is technically challenging because of the different, and even conflicting, requirements for the two techniques.^[13] TIRFM detects secretion from the bottom side of a cell adhering onto a good-optical-quality coverslip. The area of the coverslip should be large enough so that several different single cells can be recorded successively in the same run. Amperometry is traditionally carried out using a carbon-fiber microelectrode positioned near the top of a cell. To detect fusion events from the bottom side of a cell, surface microelectrodes of an optically transparent material with an excellent electrical conductivity are required. A few years ago, ITO-coated glass slides were shown to globally match these conditions^[14,15] and allow the electrochemical detection of exocytotic events (catecholamine release) from adrenal chromaffin cells, though without any adaptation to TIRFM.

Here, we found that the thickness of the ITO layer had to be reduced to 150 nm to provide suitable resolution for TIRFM images without severely increasing the electrical resistance. For amperometry, the electrode surface must be limited to ensure the minimization of nonfaradaic information (electrical noise, capacitive currents) while allowing a high signal-to-noise ratio of detection. To restrict the active electrochemical surface without compromising the probability of finding observable cells on the electrode, we designed devices consisting of four ITO bands (width 200 μm /length ranging from 2 mm to 750 μm), the active surfaces of which were delimited by a well in the thin, insulating, SU8 photoresist layer (10 μm in thickness; see Figure 1b,c and the Supporting Information).

Basically, a very thin film of ITO (150 nm in thickness) was sputtered onto a glass slide and subsequently chemically etched into four independent band-shaped microelectrodes. Photolithography techniques were used to create a circular well (2.6 mm in diameter) in an SU8 photoresist insulating layer to limit the ITO exposed surfaces and minimize the capacitive noise source. It must be emphasized that our microsystem finally presents three different surfaces (SU8/ITO/glass) exposed to the solution. A surface treatment was thus required to uniformly promote cell adhesion. This was firstly achieved through an oxygen plasma treatment, which provided hydrophilicity to the SU8 photoresist, and a subsequent collagen modification, for better cell behavior and adherence on the substratum. On such ITO surfaces and geometries, a good root-mean-square (rms) noise (less than 0.2 pA) for amperometric detection of individual exocytotic events can be reached after adhesion of a controlled number of living cells under the experimental conditions described below.

Independent amperometric and optical detections of exocytosis have already been evidenced in enterochromaffin BON cells, a cell line derived from a carcinoid tumor.^[8,9,16,17] To test the suitability of our device to concomitantly detect optical and electrochemical signals of individual exocytotic events, we used BC21 cells, a stable clone of BON cells that release the electrochemically active neurotransmitter serotonin and stably expresses green fluorescent protein-tagged neuropeptide Y (NPY-GFP), a soluble luminal marker of secretory granules. All secretory vesicles thus optically appear as green dots (Figure 2). BC21 cells (10^6 cells mL^{-1}) were plated into the well delimiting the four ITO bands (Figure 1c) and analyzed 24 h later. A few cells adhered onto each ITO band. An isolated cell could then be stimulated during 60 s by local perfusion of a saline solution supplemented with 5 μM of the calcium ionophore ionomycin.

During the stimulation, the ensuing secretory process was followed by amperometry (oxidation potential of +650 mV vs. Ag/AgCl) and optically (excitation and emission maxima at 488 and 509 nm, respectively). The low frequency of exocytosis (0.1 Hz) observed at these cells ($n=6$), as well as the controlled and spatially orientated stimulation of a single isolated cell, allowed us to relate unambiguously amperometric spikes and individual optical events as displayed in Figure 2. Among all the exocytotic events recorded, around 30% corresponded to clearly observable simultaneous

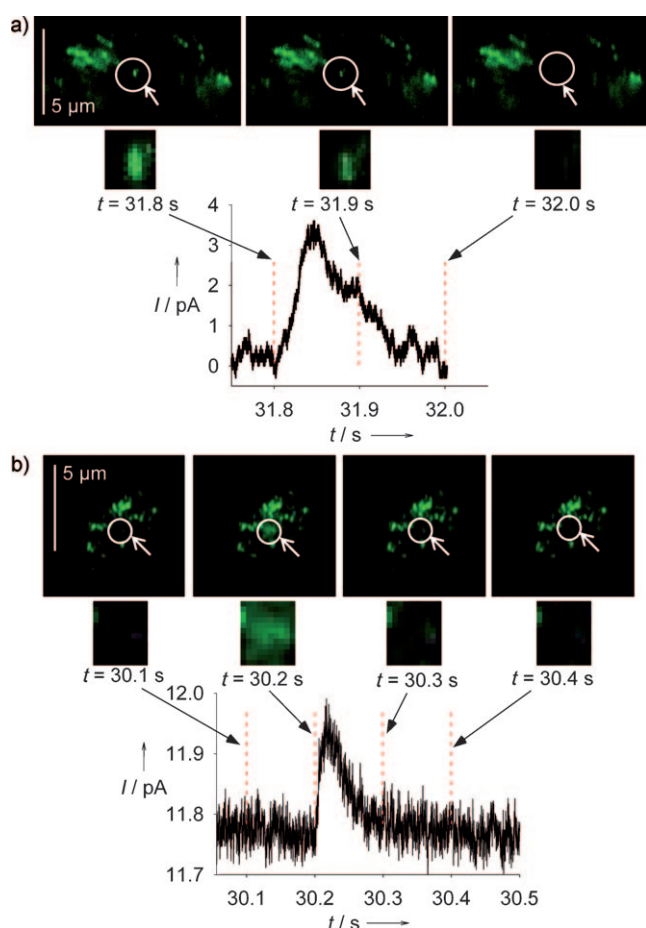


Figure 2. a, b) Two representative examples of combined analyses of an exocytotic event (top: TIRFM; bottom: amperometry) obtained with the device described. The initial time of the two amperometric and optical recordings is the same and refers to the onset of secretagogue injection. For TIRFM, the whole investigated cell is displayed and the secretory vesicles appear as green dots illuminated by the evanescent field. The single event is shown with an arrow/circle or zoomed (500%). From an optical point of view, exocytotic events are seen as rapid disappearance of the fluorescence corresponding to NPY-GFP diffusing out of the vesicles (see (a)), often preceded by a “flash” (transient increase in fluorescence and appearance of a cloud of fluorescent molecules surrounding the vesicle) as in (b). The temporal resolution of the two techniques (40 kHz, i.e., one acquisition per 25 μ s for amperometry and 10 Hz, i.e., one acquisition per 100 ms for TIRFM) is suitable for the coupled detection of these individual exocytotic events (at least 100 ms duration) even if the resolution of the TIRFM camera may be enhanced in future investigations.

TIRFM/spike signals. This fraction of correlated signals stems from the resolution of the camera used here and the low vesicular serotonin concentration.^[18] The isolated amperometric spikes detected ($n = 25$) ranged from 0.2 to 3.5 pA in magnitude and were globally consistent with those obtained independently at carbon microelectrodes on cells from the same origin stimulated with the same secretagogue ($Q = (112 \pm 15)$ fC; $I_{\max} = (2.5 \pm 0.3)$ pA; $t_{1/2} = (34 \pm 3)$ ms; six cells, 110 analyzed spikes), considering the established differences between apex/bottom releasing sites.^[19]

In summary, we have presented a microdevice that allows coupling of two complementary analytical techniques for the

direct and real-time analysis of exocytotic phenomena. The simultaneous optical and electrochemical detection of single exocytotic events was successfully demonstrated on a transparent ITO electroactive material, by using enterochromaffin human BON cells. The present methodology could be transposed in the future to other neuroendocrine cell types (e.g., PC12 cells, chromaffin cells, pancreatic β cells) or any immobilized secretory cells (e.g., neurons) that emit electroactive compounds through vesicular release and that may be tagged with fluorescent probes. This work thus sets the basis of a new methodology for quantitative, temporally and spatially resolved monitoring of single-vesicle motions and exocytosis. Notably, it will allow a correlation of the fusion-pore behavior (opening/closure dynamics, stability, measured by amperometry) with the motion of a vesicle in three dimensions (tethering, docking, fusion, retrieval, detected by TIRFM), with the recruitment of fluorescently tagged molecules onto secretory vesicles (using dual-color TIRFM), or with actin or calcium dynamics. Imaging of exocytotic events will also help to identify small amperometric signals as transient fusion pores and thus to fully benefit from the high time resolution of amperometry to study the dynamics of the fusion pore. In addition, the technique will permit comparison of the release kinetics of different-sized molecules (small transmitters measured by amperometry and large fluorescent proteins by TIRFM), as an index of fusion-pore enlargement, to simultaneously measure content mixing and lipid mixing (e.g., to detect hemifusion) or to reveal whether vesicular content/size (measured by amperometry) depends on the secretion area of the plasma membrane (by TIRFM).^[20] We thus think that this combined method will help to answer several important questions related to exocytosis (regulation of the fusion-pore dynamics, relationship between “kiss and run” and “full fusion” mechanisms, impact of the cell mechanics on fusion-pore dynamics, existence of specific spatial zones or hotspots, temporally limited or not, and devoted to particular sizes of vesicles). To the best of our knowledge, currently there are no other methods capable of such measurements.

Received: February 15, 2011

Published online: April 26, 2011

Keywords: analytical methods · electrochemistry · exocytosis · fluorescence spectroscopy · microdevices

- [1] R. D. Burgoyne, A. Morgan, *Physiol. Rev.* **2003**, *83*, 581–632.
- [2] D. M. Omiattek, A. S. Cans, M. L. Heien, A. G. Ewing, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 3269–3279.
- [3] C. Amatore, S. Arbault, M. Guille, F. Lemaître, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2585–2621.
- [4] R. M. Wightman, *Science* **2006**, *311*, 1570–1574.
- [5] W. Z. Wu, W. H. Huang, W. Wang, Z. L. Wang, J. K. Cheng, T. Xu, R. Y. Zhang, Y. Chen, J. Liut, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8914–8915.
- [6] I. Hafez, K. Kisler, K. Berberian, G. Dernick, V. Valero, M. G. Yong, H. G. Craighead, M. Lindau, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 13879–13884.
- [7] B. Zhang, K. L. Adams, S. J. Luber, D. J. Eves, M. L. Heien, A. G. Ewing, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1394–1400.

- [8] C. Desnos, S. Huet, I. Fanget, C. Chapuis, C. Borttger, V. Racine, J. B. Sibarita, J. P. Henry, F. Darchen, *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 10636–10645.
- [9] E. Karatekin, V. S. Tran, S. Huet, I. Fanget, S. Cribier, J. P. Henry, *Biophys. J.* **2008**, *94*, 2891–2905.
- [10] J. G. Burchfield, J. A. Lopez, K. Mele, P. Vallotton, W. E. Hughes, *Traffic* **2010**, *11*, 429–439.
- [11] M. Oheim, D. Loerke, W. Stuhmer, R. H. Chow, *Eur. Biophys. J.* **1998**, *27*, 83–98.
- [12] H. Schneckenburger, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 13–18.
- [13] B. X. Shi, Y. Wang, T. L. Lam, W. H. Huang, K. Zhang, Y. C. Leung, H. L. W. Chan, *Biomicrofluidics* **2010**, *4*, 043009. This recent paper describes a device devoted to investigations of exocytosis through epifluorescence and amperometry. Use of nontransparent platinum electrodes induces amperometric detection at the bottom of the cell while fluorescent measurements are achieved at the top. Attempts to combine both detections enforced the authors to reposition the studied cell on a side that is neither physiologically relevant nor suitable for routine analysis.
- [14] C. Amatore, S. Arbault, Y. Chen, C. Crozatier, F. Lemaître, Y. Verchier, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4104–4107; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4000–4003.
- [15] X. H. Sun, K. D. Gillis, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2521–2525.
- [16] D. Parekh, J. Ishizuka, C. M. Townsend, B. Haber, R. D. Beauchamp, G. Karp, S. W. Kim, S. Rajaraman, G. Greeley, J. C. Thompson, *Pancreas* **1994**, *9*, 83–90.
- [17] V. S. Tran, A. M. Marion-Audibert, E. Karatekin, S. Huet, S. Cribier, K. Guillaumie, C. Chapuis, C. Desnos, F. Darchen, J. P. Henry, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2004**, *1014*, 179–188.
- [18] 50% of the events are only TIRFM signals (vesicular serotonin concentration too low to be electrochemically detected) and 20% are solely amperometric spikes (too fast events to be detected by comparison with the camera resolution).
- [19] C. Amatore, S. Arbault, F. Lemaître, Y. Verchier, *Biophys. Chem.* **2007**, *127*, 165–171.
- [20] S. C. Ge, S. Koseoglu, C. L. Haynes, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 3281–3304.

