



HAL
open science

Mécanismes de la sécrétion régulée des hormones et des neurotransmetteurs ; rôle des GTPases Rab3 et Rab27.

Jean-Sébastien Schonn

► **To cite this version:**

Jean-Sébastien Schonn. Mécanismes de la sécrétion régulée des hormones et des neurotransmetteurs ; rôle des GTPases Rab3 et Rab27.. Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2003. Français. NNT: . tel-00011576

HAL Id: tel-00011576

<https://theses.hal.science/tel-00011576>

Submitted on 10 Mar 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PIERRE & MARIE CURIE (Paris VI)

Ecole Doctorale Inter///Bio

Mémoire de THESE

présenté par

Jean-Sébastien SCHONN

En vue d'obtenir le grade de
Docteur de l'Université Pierre & Marie Curie (Paris VI)
Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Mécanismes de la sécrétion régulée des hormones et des neurotransmetteurs ; rôle des GTPases Rab3 et Rab27.

Soutenue publiquement le 19 Septembre 2003 devant le jury composé de :

M. le Dr Bernard Poulain
M le Dr Thierry Galli
Mme le Dr Sophie Cribier
M. le Dr Jean-Antoine Girault
M. le Dr Jean-Pierre Henry
M. le Dr François Darchen

Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examinateur
Examinateur interne
Directeur de Thèse

Remerciements

J'ai su dès le début de ma thèse que la recherche est un travail d'équipe, mais c'est tout particulièrement au moment d'écrire ces remerciements que j'en prends la pleine mesure. J'aimerais remercier ici, bien sûr, toutes les personnes avec qui j'ai collaboré au quotidien, mais aussi ceux dont j'ai croisé la route plus épisodiquement, et enfin ceux avec qui je n'ai pas interagi du strict point de vue scientifique, mais qui par l'amitié et le soutien qu'ils m'ont apportés, ont été précieux durant ces (presque) 4 années.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury : les **Docteurs Bernard Poulain et Thierry Galli**, qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail, ainsi que la **Professeure Sophie Cribier** et le **Docteur Jean-Antoine Girault** d'en être les examinateurs.

J'exprime toute ma reconnaissance à **François Darchen**, qui m'a encadré tout au long de mon apprentissage au sein du laboratoire, d'abord en DEA puis en thèse. Je le remercie vivement pour la confiance et l'autonomie qu'il m'a accordées durant ces années. J'espère avoir mérité la première, et fait bon usage de la seconde. Au risque de paraphraser les remerciements figurant dans une thèse préalablement effectuée au labo, je ne peux pas m'empêcher de confesser que, moi non plus, Aude, je n'ai pas toujours tout compris aux discussions esotérico-métaphysiques des retours de cantine. Les tentatives de François pour nous initier aux subtilités de l'entropie et de la néguentropie sont, dans mon cas au moins, vraisemblablement restées vaines...

Je remercie également sincèrement **Jean-Pierre Henry** pour m'avoir ouvert les portes du laboratoire, ainsi que pour ses avis et conseils scientifiques, et enfin pour m'avoir donné la liberté de développer mes projets.

Je veux témoigner toute ma reconnaissance à **Claire Desnos**, qui au sein du triangle (François/Claire/moi) qu'a constitué l'équipe Rab entre le départ d'Aude et l'arrivée de Catherine, a toujours su amener une touche d'humour et de gaîté indispensable (non pas que François en soit dépourvu !). Pour cela, je lui pardonne ses questions récurrentes en matière d'informatique. Courage, Claire, je crois que tu es sur la bonne voie !

Merci à **Aude (Ode) Clabecq**, pour le temps que nous avons passé ensemble au labo et l'excellence de ses goûts musicaux. D'un point de vue scientifique, merci pour tes conseils et ton aide lorsque je débutais mon DEA.

Un grand merci à **Catherine Chapuis**, qui est arrivée trop tard au labo ! Son aide technique, rigoureuse et efficace, m'a été extrêmement précieuse durant ma dernière année. Son enthousiasme et son acharnement au travail n'ont d'égal que sa disponibilité et son sens du service.

Merci à **Bruno Gasnier**, pour la précision de ses informations, ses explications patientes (malgré la répétitivité de mes questions) en matière de statistiques, et ses bonnes adresses pour les amateurs de *Pasteis de Nata* ! (au passage, Bruno, je ne partirai pas en PostDoc sans la recette promise...)

Durant la dernière année, j'ai eu la chance de bénéficier des conseils avisés d'**Anne Schmidt**, notamment pour le choix de labos de Post-Docs et certains aspects de la vie en Allemagne qui s'annonce pour moi dans les années à venir. Je garderai en mémoire son énergie communicative et aussi son franc parler. Au passage, Anne, je suis sûr de n'avoir jamais vu une *droso* voler au labo avant ton arrivée !

Je remercie vivement **Marie Isambert** pour ses conseils d'horticulture, même si leur mise en œuvre n'a pas toujours été couronnée de succès. Merci pour ta bonne humeur et ton *chocolato*.

En parlant de *chocolato*, il m'est évidemment impossible de ne pas penser à mon « Cher Ami ! », il Dottore **Gian-Carlo Belenchi** ! Un grand *grazie*, donc, pour celui dont la bonne humeur latine fait pardonner son sens si particulier de la discipline du rangement de paillasse ! Bon courage pour la suite, et bon retour au pays !

Merci aux membres du groupe "Evanescence", **Sébastien Huet**, **Samuel Viet Tran** et **Isabelle Fanget** pour les heures passées à scruter les cellules chromaffines/PC12 au plus profond des granules !

Un grand merci à tous les autres membres du laboratoire, ceux de la "première heure" et les nouveaux, qui contribuent tous à l'excellente ambiance qui règne au labo. Mention spéciale à **Viviane Sébille**, qui aura déchiffré pendant 5 ans mes pattes de mouche sur le cahier de commande, (presque) sans se plaindre !

J'aimerais remercier **Gérard Sadoc**, de Gif sur Yvette, pour m'avoir patiemment initié aux joies de Dac2/Elphy.

Merci également à **Koulm Guillaumie**, qui prend le relais au "poste de thésard" dans l'équipe Rab, pour ses précieuses lignes de codes dans Elphy, dont je serais bien incapable de pondre la moitié ! Merci et bonne chance pour la suite.

Je ne saurais évoquer les collines verdoyantes de Gif sans penser à mes amis électrophysiologistes **Takeshi Shimahara** ("Shima") et **Roland Bournaud** de l'IAF. Mes séjours à Gif, pour aider Shima à massacrer des cellules chromaffines ou PC12 récalcitrantes sur le poste de patch furent, malgré le peu de succès rencontré, des expériences sympathiques et instructives. Peut-être est-ce là, coïncé entre le poste de patch et l'étireuse de micropipettes, qu'a germé l'idée saugrenue d'aller faire du patch-clamp à Göttingen ?

J'exprime toute ma reconnaissance aux membres du labo d'électrochimie de la rue Lhomond. Merci à **Stéphane Arbault**, **Delphine Bruce** et **Marie Erard** pour m'avoir initié à l'art subtil de la préparation des microélectrodes à fibre de carbone. Et pour m'avoir dépanné de quelques dizaines de ces précieux objets quand l'urgence ou la flemme de les préparer m'assaillait !

Un grand merci à mes parents pour leur soutien moral et financier durant ces longues années d'étude.

Merci enfin aux amis qui m'ont soutenu et encouragé durant ces années, et à **Keren** pour son soutien quotidien et indéfectible.

Résumé :

Les bases moléculaires de la sécrétion hormonale et de la libération de neurotransmetteurs dépendantes du calcium sont très semblables. Durant ma thèse, je me suis intéressé à divers aspects du cycle des granules de sécrétion dans des modèles cellulaires neuroendocriniens. J'ai en particulier étudié la contribution des transporteurs plasmiques de neuromédiateurs à la taille du quantum de sécrétion. Nous avons démontré que la surexpression de SERT (le transporteur plasmique de recapture de la sérotonine) au sein de la lignée neuroendocrine PC12 induit une augmentation de la taille des quanta sécrétés, et que le contrôle du remplissage vésiculaire était cinétique plutôt que thermodynamique. Ces observations ont permis de développer une méthode de mesure de l'activité sécrétrice d'une sous-population transfectée des cellules PC12. Cette technique permet de quantifier l'effet d'une protéine co-transfectée avec SERT sur l'activité sécrétrice.

Une autre partie de mon travail concerne les petites GTPases Rab. Ces protéines régulent de nombreuses étapes du trafic cellulaire. Rab3 joue un rôle dans le contrôle d'étapes tardives de la neurotransmission/sécrétion d'hormones. Nos résultats, basés sur des analyses électrochimiques et biochimiques, suggèrent que Rab3 contrôlerait l'étape d'amorçage de la fusion.

Plus récemment, notre attention s'est portée sur Rab27, une Rab proche de la famille Rab3, ainsi que sur MyRIP (Myosin and Rab Interacting Protein). Nous avons montré que MyRIP est un ligand de Rab27 et que ces deux protéines sont associées aux granules de sécrétion. MyRIP interagit aussi avec les myosines 7a/5a et avec l'actine. Ainsi, Rab27 et MyRIP lient les granules au cytosquelette d'actine et contrôlent leur mobilité au voisinage de la membrane plasmique.

Nos études sur Rab3 et Rab27 ont permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires des processus impliquant ces GTPases, et illustrent la diversité des modes d'action de ces protéines.

Summary:

Molecular bases of calcium-dependent hormone secretion and neurotransmitter release are very similar. During my PhD work, I focused on various aspects of secretory granules cycle using neuroendocrine cells as models. I particularly studied plasma membrane neurotransmitters transporters contribution to the quantal size. We demonstrated that SERT (Serotonin plasma membrane transporter) overexpression in neuroendocrine PC12 cells increases the size of release events, and that the control of secretory granules loading is kinetic rather than thermodynamic. These observations allowed to design a new approach to specifically measure the secretory activity of a transfected subset of cells within a population of PC12 cells. This method allows investigate the effect on secretory activity of any protein co-expressed with SERT.

Another part of my work was dedicated to the study of small GTPases Rabs. These proteins regulate a large number of intracellular traffic pathways. Rab3 plays a key role in late steps of neurotransmitters/hormones secretion. Our results, obtained via electrochemical and biochemical studies, suggest that Rab3 regulates the priming step of the secretory process.

More recently, we focused on MyRIP (Myosin and Rab Interacting Protein) and on Rab27, another Rab family member that is a close relative to Rab3. We demonstrated that MyRIP is a new Rab27 interaction partner and that both proteins associate with secretory granules. MyRIP also interact with both myosins 7a/5a and also with actin. Rab27 and MyRIP are thus able to tether secretory granules to the actin cytoskeleton and to control their mobility in the vicinity of plasma membrane.

Our studies on Rab3 and Rab27 allowed us to better understand molecular mechanisms of the process involving these GTPases. They also illustrate the diversity of functions of these proteins.

Publications

Revue à comité de lecture :

El-Amraoui, A., **Schonn, J. S.**, Kussel-Andermann, P., Blanchard, S., Desnos, C., Henry, J. P., Wolfrum, U., Darchen, F. and Petit, C. EMBO Reports (2002). **3**(5): 463-70. "MyRIP, a novel Rab effector, enables myosin VIIa recruitment to retinal melanosomes"

Schonn, J. S., Desnos, C., Henry, J. P. and Darchen, F. Journal of Neurochemistry (2003). **84**(4): 669-77. "Transmitter uptake and release in PC12 cells overexpressing plasma membrane monoamine transporters"

Sous presse à la date de soumission du manuscrit de thèse :

Desnos, C§., **Schonn, J. S**§., Huet, S., Tran, S., El-Amraoui, A., Raposo, G., Fanget, I., Chapuis, C., Ménasché, G., de Saint Basile, G., et al. Journal of Cell Biology (2003). . "Rab27A and its effector MyRIP link secretory granules to F-actin and control their motion towards release sites"
(§ égales contributions à ce travail)

Autre :

Schonn, J. S., Desnos, C., Darchen, F. and Henry, J. P. Annals of New-York Academy of Sciences (2002). **971**: 291-3. "Which step of exocytosis is regulated by the monomeric GTPase Rab3a?"

I.A. SECRETION REGULEE	8
I.A.1. NEUROTRANSMISSION CHIMIQUE	8
I.A.2. LIBERATION DES HORMONES	9
I.A.3. LIBERATION QUANTIQUE ET HYPOTHESE VESICULAIRE	9
I.A.4. CYCLE DES VESICULES SYNAPTIQUES	10
I.A.4.a. Biogenèses des vésicules et granules sécrétoires. Remplissage vésiculaire.	11
I.A.4.b. Transport des VS à la membrane plasmique; rôle du cytosquelette	12
I.A.4.b.i. Le réseau d'actine contrôle la mobilité vésiculaire	12
I.A.4.c. L'arrimage des VS à la membrane plasmique	13
I.A.4.c.i. Le complexe SNARE	13
I.A.4.c.i.a. Les familles de SNAREs	14
I.A.4.c.i.b. Structure du complexe SNARE	14
I.A.4.c.i.c. Rôle de NSF	15
I.A.4.c.ii. Les SNAREs sont les cibles d'action des toxines clostridiales	15
I.A.4.c.iii. L'hypothèse SNARE en 1993 et aujourd'hui	16
I.A.4.c.iii.a. Les SNAREs comme déterminants de l'identité membranaire	16
I.A.4.c.iii.b. Les SNAREs dans la phase d'arrimage	17
I.A.4.c.iii.c. Les SNAREs dans la fusion membranaire	19
I.A.4.d. La préparation fonctionnelle à la fusion – L'amorçage	19
I.A.4.d.i. L'amorçage nécessite du Ca^{2+} et de l'ATP	20
I.A.4.d.ii. NSF dissocierait les cis SNAREs durant l'amorçage	20
I.A.4.d.iii. Munc13 et la maturation des SNAREs	20
I.A.4.d.iv. Microdomaines lipidiques et phase d'amorçage	21
I.A.4.d.v. Le "serré" et le "relâché"	22
I.A.4.e. Le déclenchement de la fusion - Rôle du calcium	24
I.A.4.e.i. Architecture des domaines calciques	24
I.A.4.e.ii. La synaptotagmine est-elle le senseur calcique de l'exocytose ?	26
I.A.4.e.ii.a. Insertion membranaire et oligomérisation de la synaptotagmine	28
I.A.4.e.ii.b. Liaison de la synaptotagmine aux SNAREs et à d'autres partenaires	29
I.A.4.f. La fusion membranaire. Le pore de fusion	29

I.A.4.f.i. Le pore de fusion lipidique	29
I.A.4.f.i.a. Les protéines fusogènes virales	30
I.A.4.f.i.b. Rôle des SNAREs dans la fusion membranaire	31
I.A.4.f.ii. Pore protéolipidique : l'hypothèse V0	33
I.A.4.g. Le recyclage des VS – L'endocytose	35
I.B. CONCLUSION ET BUT DU TRAVAIL	36

II. INFLUENCE DES TRANSPORTEURS PLASMIQUES DE RECAPTURE DE MONOAMINES SUR LA TAILLE DU QUANTUM DE SECRETION **39**

II.A. INTRODUCTION	40
II.A.1. LES FLUX IONIQUES ET DE NEUROTRANSMETTEURS	40
II.A.2. COMPENSATION OSMOTIQUE ; FLUX IONIQUES COMPENSATEURS	42
II.A.3. STRUCTURE ET COMPOSITION DES LUMENS GRANULAIRE ET VESICULAIRE	43
II.A.4. TRANSPORT VESICULAIRE DE MONOAMINES - LES VMAT	44
II.A.5. FACTEURS INFLUENÇANT LA TAILLE DU QUANTUM DE SECRETION	45
II.A.5.a. Modification de l'activité des transporteurs vésiculaires	46
II.A.5.b. Altération du gradient de proton	47
II.A.5.b.i. Action sur la V-ATPase	47
II.A.5.b.ii. Action de bases faibles	48
II.A.5.c. Modification de la concentration cytosolique en neurotransmetteur	48
II.A.5.c.i. Accroissement direct ou indirect du pool cytosolique de monoamines	48
II.A.5.c.ii. Diminution du pool cytosolique	49
II.A.5.c.iii. Modification du transport plasmique de monoamines	50
II.B. INFLUENCE DE L'EXPRESSION DE TRANSPORTEURS PLASMIQUES DE RECAPTURE DES MONOAMINES SUR LA TAILLE DU QUANTUM DE SECRETION	50
II.B.1. CONTEXTE DE L'ETUDE - BREF HISTORIQUE	50
II.B.2. LES CELLULES PC12 SONT DEPOURVUES DE TRANSPORT EFFICACE DE LA 5-HT	52
II.B.3. L'EXPRESSION DE SERT INDUIT UNE CONSIDERABLE ACCUMULATION DE [³ H]5-HT DANS LES PC12	53
II.B.4. MECANISMES REGULATEURS DE L'ACTIVITE DE SERT	57
II.B.4.a. Régulation de SERT par [Ca ²⁺] _i	57
II.B.4.b. Régulation de SERT par les flux ioniques	57

II.B.4.c.	Régulation de SERT par des mécanismes de phosphorylation	57
II.B.4.d.	Régulation de l'activité de SERT par l'usage	59
II.B.5.	LES MONOAMINES OXYDASES ABAISSENT LE TAUX DE MONOAMINES CYTOSOLIQUES	59
II.B.6.	L'ACCUMULATION CELLULAIRE DE [³ H]5-HT INDUITE PAR L'EXPRESSION DE SERT REFLETE UN ACCROISSEMENT DU CONTENU GRANULAIRE, ET NON CYTOSOLIQUE	61
II.B.7.	LA [³ H]5-HT ACCUMULEE PEUT FUIR DES GRANULES	62
II.B.8.	LA SUREXPRESSION DE SERT DANS LES CELLULES PC12 INDUIT UNE AUGMENTATION DE LA TAILLE QUANTIQUE DE 5-HT	65
II.B.9.	LE NIVEAU DE REMPLISSAGE EN MONOAMINES DES VESICULES RESULTE D'UN EQUILIBRE COMPLEXE	68
II.B.10.	CINETIQUE OU THERMODYNAMIQUE ?	69
II.C.	L'EXPRESSION DES TRANSPORTEURS PLASMIQUES DES MONOAMINES : UN OUTIL POUR LA MESURE DE L'ACTIVITE SECRETRICE DES CELLULES PC12	70
II.C.1.	L'EXPRESSION DE SERT N'AFPECTE PAS LA SENSIBILITE DE LA MACHINERIE D'EXOCYTOSE VIS-A-VIS DU CALCIUM	70
II.C.2.	EFFICACITE DE CO-TRANSFECTION	73
II.C.3.	VALIDATION DU TEST DE LIBERATION DE [³ H]5-HT	74
II.C.4.	ROBUSTESSE DU TEST	75
II.C.4.a.	Relative invariance vis-à-vis de la quantité de vecteur codant SERT	76
II.C.4.b.	Relative invariance vis-à-vis de la concentration extracellulaire en [³ H]5-HT	77
II.C.4.c.	Relative invariance vis-à-vis du temps de capture de [³ H]5-HT	78
II.C.5.	CONCLUSIONS – AVANTAGES DU TEST DE MESURE DE L'ACTIVITE SECRETRICE BASE SUR LA CO-EXPRESSION DE SERT	79
III.	LES PROTEINES RAB	91
III.A.	LA SUPERFAMILLE RAS	92
III.A.1.	RAS	92
III.B.	LES PROTEINES RAB/YPT	93
III.B.1.	STRUCTURE ET DETERMINANTS COMMUNS	93
III.B.1.a.	Boucle P	94
III.B.1.b.	Régions "switch"	95
III.B.1.b.i.	Switch I	95

III.B.1.b.ii. Switch II	95
III.B.1.c. Rab-CDR	96
III.B.1.d. Motifs NKXD et EXSAK	97
III.B.2. MUTANTS PONCTUELS	97
III.B.3. ROLE DANS LE TRAFIC MEMBRANAIRE ET LOCALISATION SUB-CELLULAIRE	98
III.C. LES PROTEINES RAB3	99
III.C.1. LOCALISATION ET EXPRESSION	100
III.C.1.a. Localisations cellulaire et subcellulaire	100
III.C.1.a.i. Rab3a	100
III.C.1.a.ii. Rab3b	101
III.C.1.a.iii. Rab3c	102
III.C.1.a.iv. Rab3d	103
III.C.2. CYCLE FONCTIONNEL DES PROTEINES RAB ET DES RAB3 EN PARTICULIER.	
IMPORTANCE DES REGULATEURS DE L'ACTIVITE DE RAB3	104
III.C.2.a. Isoprénylation	104
III.C.2.b. Prise en charge par Rab-GDI, association à la membrane des VS	106
III.C.2.c. L'échange GDP/GTP	107
III.C.2.c.i. Mss4	107
III.C.2.c.ii. Aex-3 & Rab3-GEP	108
III.C.2.c.iii. GRAB	108
III.C.2.d. Fixation des effecteurs et hydrolyse du GTP. Rôle de Rab3GAP	109
III.C.2.e. Dissociation de la membrane et terminaison du cycle	110
III.C.3. ROLE DE RAB3 DANS LA SECRETION REGULEE	111
III.C.3.a. Quelques arguments en faveur d'un rôle inhibiteur de Rab3	115
III.C.3.b. Apport des KO de Rab3	116
III.C.3.c. Quelques arguments pour un rôle stimulateur de Rab3	118
III.C.3.c.i. Le KO de Rab3 chez <i>C. elegans</i>	118
III.C.3.c.ii. Rab3a et réaction acrosomique	119
III.C.3.d. Rab3 et sensibilité au Ca ²⁺ de la réponse sécrétrice	120
III.C.3.e. Rab3 et le complexe SNARE	121
III.C.3.f. Autres aspects du rôle des Rab3	122
III.C.3.g. Conclusion – Quel rôle pour Rab3 ?	122
III.C.4. EFFECTEURS CONNUS DE RAB3	123

III.C.4.a. La Rabphiline	123
III.C.4.a.i. La Rabphiline comporte trois domaines fonctionnels	123
III.C.4.a.ii. Interaction Rab3/Rabphiline ; données cristallographiques	125
III.C.4.a.iii. Expression et localisation subcellulaire de la Rabphiline	126
III.C.4.a.iv. Fonctionnalité de l'interaction Rab3/Rabphiline	126
III.C.4.a.v. Rôle de la Rabphiline dans le contrôle de l'exocytose	127
III.C.4.a.vi. Rôles de la Rabphiline à d'autres étapes du cycle des VS	128
III.C.4.b. RIM	129
III.C.4.b.i. KO de RIM chez la souris et le nématode	129
III.C.4.b.ii. Interaction RIM/Munc13	131
III.C.4.c. Noc2	133
III.C.4.d. Calmoduline	134
III.C.4.e. Rak3D	135
III.C.4.f. PI3K	135
III.C.4.g. Synapsines	136
III.D. RESULTATS : CARACTERISATION DE L'EFFET INHIBITEUR DE RAB3A:GTP DANS DES CELLULES NEUROENDOCRINES.	137
III.D.1. RAB3AQ81L INHIBE PREFERENTIELLEMENT LES PHASES PRECOCES DE LA SECRETION REGULEE.	138
III.D.1.a. Effet de Rab3aQ81L sur la sécrétion de populations de cellules PC12.	138
III.D.1.b. Effet de Rab3aQ81L sur la sécrétion de cellules PC12 et chromaffines bovines individuelles mesurée par ampérométrie à fibre de carbone.	139
III.D.2. RAB3AQ81L INDUIT UN RETARD A L'INITIATION DE LA SECRETION.	140
III.D.3. RAB3AQ81L NE MODIFIE PAS LA SENSIBILITE DE L'EXOCYTOSE VIS-A-VIS DU CALCIUM.	143
III.D.4. RAB3A :GTP INHIBE PREFERENTIELLEMENT LA PHASE DE L'EXOCYTOSE DEPENDANTE DE L'ATP.	144
III.D.5. DISCUSSION	146
III.D.5.a. Augmentation de la libération basale	146
III.D.5.b. Effet de Rab3 sur l'arrimage	150
III.D.5.c. Effet de Rab3 sur l'amorçage	150
III.E. MYRIP ET LES PROTEINES RAB27	155
III.E.1. CARACTERISATION DE MYRIP, UN NOUVEL EFFECTEUR DE RAB27	155

III.E.1.a. Maladies génétiques associant surdité et dégénérescence de la pigmentation rétinienne	155
III.E.1.a.i. Le syndrome de Usher	155
III.E.1.b. Résultats	165
III.E.1.c. Discussion	166
III.E.2. ROLES DE MYRIP ET RAB27A DANS LA SECRETION REGULEE	168
III.E.2.a. Introduction	168
III.E.2.a.i. Implication de Rab27 dans la choroïdérémie	169
III.E.2.a.ii. Rab27 et syndrome de Griscelli	169
III.E.2.a.ii.a. Syndromes de Griscelli et de Elejalde	169
III.E.2.a.iii. Le mélanosome et autres organelles apparentées au lysosomes	171
III.E.2.a.iv. Leaden, dilute et ashen	172
III.E.2.a.v. Les familles Slp/Slac2	173
III.E.2.b. Résultats	187
III.E.2.c. Discussion	189
III.E.2.c.i. Liaison de MyRIP aux myosines et à l'actine	189
III.E.2.c.ii. Effet de Rab27a/MyRIP sur la sécrétion	191
IV. CONCLUSIONS – PERSPECTIVES	195
IV.A. PROJET SERT	195
IV.B. PROJET RAB3	196
IV.B.1. POURSUITE DE LA CARACTERISATION DU RETARD AU DECLENCHEMENT INDUIT PAR RAB3A:GTP	197
IV.B.2. RAB3 ET LES STOCKS INTRACELLULAIRE DE Ca^{2+}	199
IV.B.3. APPORT DE LA MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE PAR ONDE EVANESCENTE	199
IV.C. PROJET RAB27 & MYRIP	200
IV.C.1. LES DIFFERENTS MODES DE LIAISON DE MYRIP A L'ACTINE	201
IV.C.2. INTERACTION VESICULES SYNAPTIQUES/ACTINE	201
V. MATERIELS ET METHODES	203
V.A. BIOLOGIE CELLULAIRE	203
V.A.1. CELLULES CHROMAFFINES DE LA MEDULLOSURRENALE	203

V.A.1.a.	Préparation des cellules chromaffines de la médullo-surrénale bovine.	203
V.A.1.b.	Transfection par électroporation	204
V.A.2.	CELLULES PC12	205
V.A.2.a.	Conditions de culture	205
V.A.2.b.	Transfection par lipofection	205
V.B.	DETECTION AMPEROMETRIQUE DES CATECHOLAMINES PAR AMPEROMETRIE A FIBRE DE CARBONE	206
V.B.1.	PRINCIPE	206
V.B.2.	FABRICATION DES ULTRA-MICROELECTRODES	207
V.B.3.	ENREGISTREMENT DE LA LIBERATION DE CATECHOLAMINES.	208
V.B.3.a.	Stimulation des cellules	208
V.B.3.b.	Acquisition des traces	209
V.C.	MESURE DE LA SECRETION DE [³H]5-HT SUR POPULATION DE CELLULES PC12	210
VI.	BIBLIOGRAPHIE	211

Chapitre I

Introduction Générale

I. Introduction générale

La libération contrôlée par le calcium des hormones et des neurotransmetteurs joue un rôle primordial dans la biologie des organismes eucaryotes pluricellulaires; les 2 phénomènes reposent sur le même principe : la fusion d'un organe cellulaire hautement spécialisé (vésicule synaptique ou granule de sécrétion) contenant la molécule informative avec la membrane plasmique de la cellule, afin d'en déverser le contenu dans la fente synaptique ou le flux sanguin, respectivement.

Il est désormais clair que, malgré la différence des types cellulaires impliqués, la libération de neurotransmetteurs et la sécrétion hormonale partagent de très nombreux acteurs moléculaires. On peut même aller plus loin, en remarquant que l'appareillage protéique assurant la sécrétion régulée des hormones et des neurotransmetteurs est souvent une adaptation, certes réussie et performante, de processus existant dans l'ensemble des cellules eucaryotes, même les plus "primitives". La connaissance de ces différents acteurs a réalisé d'énormes progrès au cours des 2 dernières décennies. Ainsi, de nombreuses molécules impliquées dans la sécrétion régulée, c'est-à-dire déclenchée par un stimulus, ont été identifiées; un certain nombre de leurs propriétés biochimiques ont été établies, mais il reste encore de nombreuses lacunes pour comprendre de façon globale le mécanisme complexe de la fusion d'une vésicule synaptique (VS) ou d'un granule sécrétoire (GS) avec la membrane plasmique.

I.A. Sécrétion régulée

I.A.1. Neurotransmission chimique

La communication entre les cellules du système nerveux nécessite une transmission rapide de l'information, propagée sous forme d'une modification du potentiel membranaire des neurones (potentiel d'action), de la cellule émettrice vers la cellule réceptrice. Deux types de connexions permettent d'assurer cette transmission rapide de l'information; d'une part, les synapses "électriques", où le potentiel transmembranaire passe directement d'une cellule

nerveuse à l'autre (ce mode de transmission ne sera pas détaillé ici); d'autre part, les synapses "chimiques", où la transmission de l'information dépend de la libération de messagers chimiques (consécutive à une élévation de $[Ca^{2+}]_i$) dans la fente synaptique séparant physiquement les deux cellules nerveuses; les neurotransmetteurs (NT), en se fixant sur leurs récepteurs situés sur la membrane post-synaptique, induisent une variété d'effets sur la cellule réceptrice qui vont modifier sa capacité à émettre à son tour, un potentiel d'action.

I.A.2. Libération des hormones

Dans le cas de la libération hormonale, l'arrivée d'un stimulus déclenche la libération d'hormone par la cellule, cette fois dans le flux sanguin; contrairement à la transmission synaptique chimique, qui prend place sur des échelles spatiales et temporelles réduites (quelques centaines de nanomètres entre les deux cellules et un délai de quelques millisecondes), les mécanismes hormonaux mettent en jeu des cellules émettrices et réceptrices qui peuvent être éloignées de plusieurs mètres, avec un délai d'action pouvant varier de la seconde à plusieurs jours.

I.A.3. Libération quantique et hypothèse vésiculaire

La démonstration de la libération quantique des neurotransmetteurs date des travaux historiques de Katz et de ses collègues, dans le courant des années 1950.

À la jonction neuromusculaire (JNM) de grenouille, les potentiels post-synaptiques excitateurs miniatures (PPSEm) spontanés (observés en l'absence de stimulation du nerf pré-synaptique) ont une amplitude fixe et les PPSE évoqués par une stimulation ont une amplitude correspondant à un multiple entier de la valeur du PPSEm. Divers travaux de microscopie électronique, réalisés sur des terminaisons synaptiques vers 1955, ont montré l'existence d'organites cellulaires de petite taille (~50 nm, les vésicules synaptiques "claires") concentrés en grand nombre dans les terminaisons synaptiques (de $300 \cdot 10^3$ à $600 \cdot 10^3$ dans une JNM).

Sur la base de ces travaux, Katz et ses collaborateurs proposèrent les bases de la théorie vésiculaire : les VS observées à la synapse contiennent le(s) neurotransmetteur(s) (à la JNM, l'acétylcholine, ACh) ; le contenu vésiculaire est libéré dans la fente synaptique par un mécanisme impliquant la fusion de la VS avec la membrane plasmique; les modalités de cette fusion membranaire seront discutées plus loin dans cette introduction. La fixation du

neurotransmetteur à ses récepteurs spécifiques sur la membrane du neurone post-synaptique entraîne l'activation ou l'inactivation de différentes conductances ioniques, qui modulent la capacité de la cellule réceptrice à propager un signal nerveux.

I.A.4. Cycle des vésicules synaptiques

La VS est donc l'acteur principal de la transmission synaptique, de même que le GS joue ce rôle dans la libération des hormones. Ces organites subissent un cycle complexe depuis leur formation jusqu'à leur recyclage, qui fait intervenir probablement des centaines de molécules spécialisées. Un certain nombre de ces molécules sont directement portées par les VS ou les GS eux-mêmes. Ces protéines, intégrales ou non, jouent des rôles très différents et interviennent à toutes les étapes du cycle de la VS ou du GS. Le rôle d'un certain nombre d'entre elles sera détaillé dans ce qui suit.

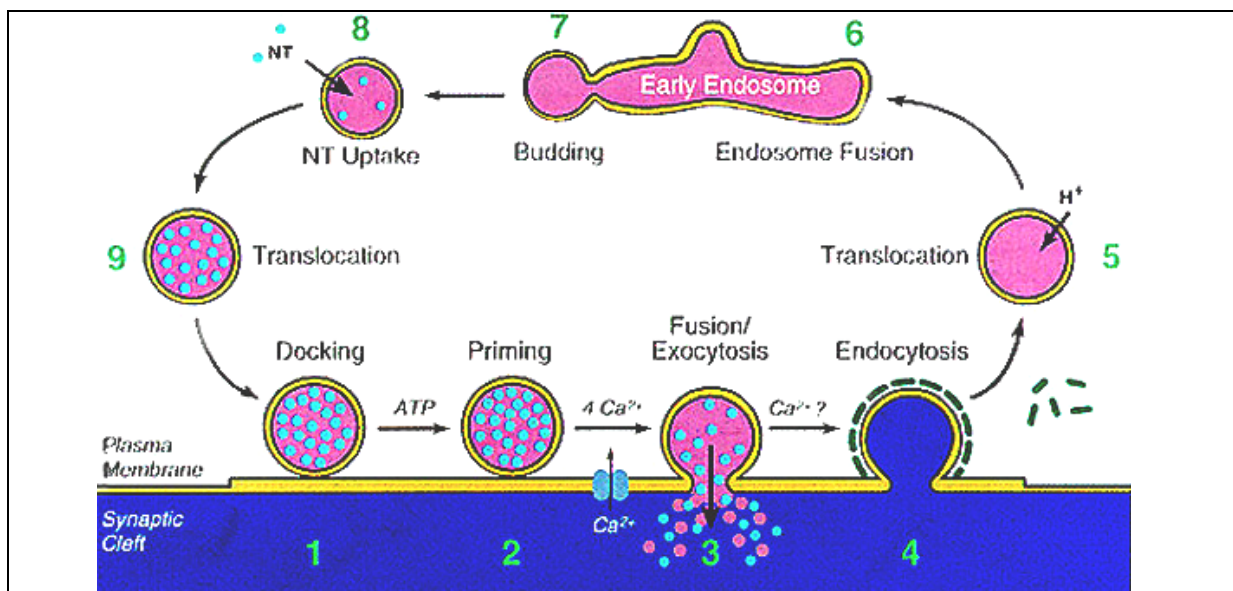


Figure 1

Une vue simplifiée des étapes du cycle des VS à la terminaison synaptique. Les VS seraient formées à la présynapse par bourgeonnement depuis des endosomes précoces. Après remplissage en NT par l'activité de transporteurs vésiculaires *ad hoc* et translocation vers la membrane plasmique, les VS sont arrivées à celle-ci ("tethering" puis "docking"). Les VS doivent alors subir une maturation fonctionnelle nécessitant la présence de Ca^{2+} et d'ATP (amorçage, ou "priming") afin d'acquérir la compétence à la fusion. Lors de la fusion, déclenchée par un influx de Ca^{2+} , le contenu vésiculaire est déversé dans la fente synaptique, par fusion complète de la VS avec la membrane plasmique, ou bien par déversement partiel ("kiss and run"). Les composants de la VS (lipides, protéines) sont ensuite recyclés par la voie d'endocytose, aboutissant aux compartiments endosomaux. Adapté de Fernandez-Chacon *et al.*, 1999.

I.A.4.a. Biogénèses des vésicules et granules sécrétoires. Remplissage vésiculaire.

Si les organites spécialisés (granules de sécrétion à cœur protéique dense, LDCV, ~100 à 300 nm de diamètre) contenant des NT de nature peptidique, comme les endorphines ou les enképhalines, sont formés directement au niveau du corps cellulaire du neurone après de complexes maturations, il en va différemment pour ceux ne renfermant pas de neuropeptides, mais des NT dits classiques (principalement des aminoacides ou leurs dérivés), comme le GABA, la glycine, l'ACh, l'adrénaline, le glutamate, etc. Ceux-ci dériveraient des compartiments de type endosomes précoces localisés à proximité des zones actives du neurone pré-synaptique, ou de spécialisations de la membrane plasmique.

En effet, dans la plupart des synapses, et pour celles à forte activité en particulier, il n'est pas concevable que le renouvellement des VS de la pré-synapse dépende du flux neuronal antérograde (~40 cm/jour) depuis le soma cellulaire, qui peut se trouver à des distances considérables. Ainsi, un système de recyclage performant existe au niveau pré-synaptique qui permet de s'affranchir très largement des livraisons depuis le soma.

Un aspect évidemment important du cycle d'une VS est son remplissage (ou re-remplissage) en NT; celui-ci peut être issu d'une synthèse *de novo* ou bien provenir de la recapture des produits précédemment libérés et récupérés par la présynapse, après un passage éventuel par la glie.

Dans les deux cas, le NT est accumulé contre son gradient de concentration dans la lumière de la VS ou du GS grâce aux activités de molécules spécialisées, les transporteurs vésiculaires de NT. Ces molécules catalysent un antiport de NT contre des protons, eux-mêmes accumulés dans les organites par l'activité de l'ATPase/pompe à protons vésiculaire (V-ATPase). Il s'agit donc de transports actifs secondaires, exploitant la force motrice du gradient d'ions H⁺ pour accumuler à très fortes concentrations le NT (ou l'hormone) dans la VS ou le GS (pour une revue, voir Sulzer *et al.*, 2000).

La modulation de l'activité des différents transporteurs vésiculaires spécialisés, en terme d'affinité pour le NT ou de vitesse de transport est donc un élément régulateur clé de la libération de NT. Par ailleurs, d'autres transporteurs non pas vésiculaires mais plasmiques, jouent un rôle considérable dans ce phénomène de remplissage vésiculaire. De nombreuses molécules médicamenteuses ont pour cibles ces transporteurs, avec de nombreux effets, en particulier au niveau de la taille quantale.

I.A.4.b. Transport des VS à la membrane plasmique; rôle du cytosquelette

Une fois constitués, les GS ou les VS doivent rejoindre la membrane plasmique. Le réseau microtubulaire intervient dans le transport à longue distance. Plus proche de la membrane plasmique, c'est le cytosquelette d'actine qui prend en charge ces "cargos". Cet aspect sera discuté de manière plus détaillée dans la partie consacrée à MyRIP et à Rab27, mais les grandes lignes du rôle de l'actine subplasmalemmale sont présentées ici.

I.A.4.b.i. Le réseau d'actine contrôle la mobilité vésiculaire

Certains arguments expérimentaux démontrent que le réseau d'actine cortical tel qu'on peut le trouver en particulier dans les cellules chromaffines sous forme d'une structure extrêmement dynamique dans le temps, joue un rôle double dans le déroulement de l'exocytose.

Des études de microscopie électronique montrent que le réseau extrêmement dense constitué par les fibres d'actine pourrait immobiliser les GS au sein de véritables "cages" de filaments, dont la maille est inférieure au diamètre granulaire moyen (Nakata *et al.*, 1992).

Ce réseau est désorganisé lors de la stimulation de la libération (Sontag *et al.*, 1988), permettant la migration des GS vers les sites d'exocytose, celle-ci se faisant au niveau des zones où l'actine est dépolymérisée (Vitale *et al.*, 1991). Il semble même possible d'induire l'exocytose par une dépolymérisation modérée de l'actine corticale par certaines toxines (telles que les latrunculines A/B, les cytochalasines A/B ou la toxine C2 de *C. botulinum* (Sontag *et al.*, 1988 ; Muallem *et al.*, 1995).

Ceci amène à considérer le réseau d'actine comme une barrière, qui doit être levée lors de la stimulation pour permettre l'accès des GS à la membrane plasmique. Ce processus fait intervenir des protéines sensibles au Ca^{2+} capables de découper les filaments d'actines, comme la scindérine (Vitale *et al.*, 1991; Trifaro *et al.*, 2000).

Une corrélation nette entre degré de polymérisation du cortex d'actine et mobilité des GS au voisinage de la membrane plasmique est observée, i.e. la mobilité décroît avec le degré de réticulation du cortex d'actine (Lang *et al.*, 2000; Oheim *et al.*, 2000). Cependant, ces études ont aussi montré que la dépolymérisation de l'actine diminuait le nombre de vésicules ayant une vitesse de déplacement élevée. Des filaments ou des fibres de stress pourraient donc aussi favoriser le mouvement des vésicules, via l'intervention de moteurs moléculaires. Si la

dépolymérisation partielle du cortex d'actine stimule l'exocytose, le phénomène inverse est observé lors de sa destruction totale (Li *et al.*, 1994b ; Muallem *et al.*, 1995), ceci illustrant l'importance d'un réseau d'actine cortical dynamique, jouant à la fois un rôle de barrière physique limitant l'accès à la membrane plasmique mais aussi probablement de guide au déplacement des GS vers cette membrane.

L'expérience décrite par Matter et coll. illustre bien la dualité du rôle de l'actine; la dépolymérisation du cortex d'actine par la toxine C2 de *C. botulinum* augmente dans un premier temps la sécrétion de cellules PC12 (retrait de la "barrière" d'actine), mais l'inhibe par la suite en déstructurant le réseau de guides permettant l'acheminement des GS vers la membrane plasmique (Matter *et al.*, 1989).

Dans le cas de l'exocytose neuronale, le réseau d'actine semble plus dédié à l'organisation périphérique des zones actives (Sankaranarayanan *et al.*, 2003), avec la fixation des pool de réserves via les synapsines, une famille de protéines reliant les VS aux filaments d'actine (pour une revue, voir Brodin *et al.*, 1997). L'intervention de moteurs moléculaires, comme les myosines II ou V dans le cas des VS, permettrait un déplacement dirigé des cargos le long des fibres d'actine (Prekeris *et al.*, 1997; Evans *et al.*, 1998).

1.A.4.c. L'arrimage des VS à la membrane plasmique

Deux grandes familles de protéines ont un rôle important dans ce processus : les GTPases de la famille Rab, qui seront décrites dans un chapitre suivant, et les protéines SNAREs.

1.A.4.c.i. Le complexe SNARE

Un problème central dans l'étude du trafic intracellulaire est le maintien de l'identité des compartiments vésiculaires. Quels sont les déterminants de cette identité ? Quel sont les mécanismes qui orientent chaque vésicule vers sa destination correcte ? Ce sont les travaux du groupe de James Rothman au cours des années 1980 qui ont mené à l'identification des protéines composant le complexe SNARE (Sollner *et al.*, 1993a; Sollner *et al.*, 1993b). La première étape de cette découverte fut la purification de NSF (N-éthylmaléimide sensitive factor/fusion protein), capable de catalyser *in vitro* le transport vésiculaire (Block *et al.*, 1988). Cette protéine, soluble dans le cytosol, est capable de se lier aux membranes par

association à des complexes protéiques nommées SNAPs (soluble NSF attachment proteins, $\alpha/\beta/\gamma$), eux-mêmes solubles. Le groupe de Rothman mit en évidence des récepteurs capables de lier ces SNAPs sur les membranes des compartiments vésiculaires et cibles, dénommés SNAREs (SNAPs receptors). L'identification moléculaire des SNAREs neuronaux par ce groupe montra que ces protéines étaient déjà connues, en l'occurrence la syntaxine 1, SNAP-25 (synaptosome-associated protein of 25 kDa) et la synaptobrevine/VAMP (Vesicular associated membrane protein, une protéine intégrale de la membrane des VS).

I.A.4.c.i.a. Les familles de SNAREs

Les syntaxines constituent une famille de protéines transmembranaires (12 membres chez les mammifères, 7 chez la levure), contenant un domaine "coiled-coil", très conservé au sein de la famille. SNAP-25 (17 gènes chez les mammifères, 11 chez la levure), et son homologue SNAP-23, contiennent chacun 2 motifs similaires à ceux des syntaxines. Ces protéines ne sont pas transmembranaires, mais ancrées aux membranes par 4 cystéines palmitoylées (Hess *et al.*, 1992). SNAP-29, une isoforme non associée aux membranes car non palmitoylée, a été rapportée mais son rôle reste à déterminer (Steggmaier *et al.*, 1998). D'autres membres de la famille VAMP (9 gènes chez les mammifères, 5 chez la levure) sont impliqués dans les autres étapes du trafic intracellulaire.

Les travaux du groupe de Rothman démontrèrent que les protéines SNAP-25 et syntaxine constituaient les récepteurs des SNAPs sur la membrane plasmique, d'où leur dénomination de tSNAREs (target SNAREs), tandis que la VAMP2/synaptobrevine constituait le vSNARE (vesicular SNARE).

I.A.4.c.i.b. Structure du complexe SNARE

Ces 3 molécules s'associent pour former un complexe très stable (nommé particule 7S, en référence à son coefficient de sédimentation ; *in vitro*, un chauffage à ébullition en présence de SDS est nécessaire à sa dissociation). Cette stabilité s'explique par la constitution d'une structure associant 4 hélices α , correspondant aux motifs "coiled-coil" (motif SNARE) des différents partenaires (voir Figure 2). La formation du complexe SNARE tripartite débiterait en fait par la formation d'un premier complexe entre la syntaxine (un motif SNARE) et SNAP-25 (2 motifs SNARE), qui seraient peu structurés sous forme monomérique. Leur association entraîne d'importants changements conformationnels, avec

une augmentation de leur hélicité (Fasshauer *et al.*, 1997). C'est le complexe des t-SNAREs syntaxine/SNAP-25 qui recruterait ensuite le v-SNARE synaptobrevine. Les 4 motifs SNARE, associés en un faisceau d'hélices α parallèles (Hanson *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1997b) (voir Figure 2) de basse énergie dont la structure a été résolue (Sutton *et al.*, 1998) permettraient le rapprochement des membranes cibles et vésiculaires (complexe SNAREs en *trans*). La structure du "core complex" (assemblage des motifs SNARE) confirme l'orientation parallèle des hélices, la présence de plusieurs couches d'acides aminés hydrophobes, ainsi que la présence d'un groupe de résidus polaires, au centre du complexe. Ces acides aminés (2 glutamines de SNAP-25, une glutamine de la syntaxine et une arginine de VAMP) joueraient un rôle dans la dissociation du complexe par NSF. Cette observation a conduit à une nouvelle classification des SNAREs en R-SNARE et Q-SNARE, et à la proposition que tous les complexes sont formés par l'association de 3 Q-SNAREs et d'un R-SNARE (Fasshauer *et al.*, 1998).

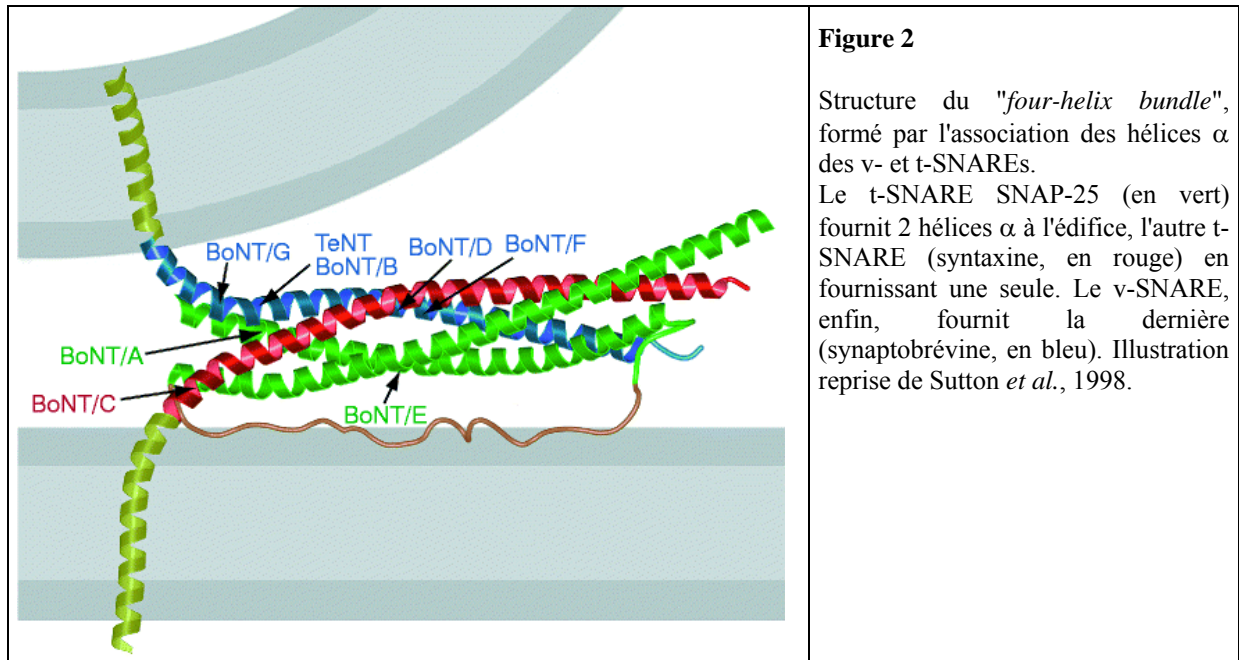
I.A.4.c.i.c. Rôle de NSF

Le rôle de NSF serait de dissocier les complexes SNAREs formés en *cis*, (i.e. sur la même membrane) en utilisant l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP (Sollner *et al.*, 1993a). Ce sont en fait les SNAPs qui reconnaissent les complexes SNAREs en *cis*, et qui recrutent ensuite NSF. Les complexes SNAREs en *trans* ne sont pas dissociables par NSF (Weber *et al.*, 2000). Comme NSF et l'ATP semblent requis pour des étapes en amont de la fusion, son rôle est probablement de dissocier les complexes *cis* présents sur les VS et la membrane plasmique avant la fusion (Banerjee *et al.*, 1996; Mayer *et al.*, 1996; voir la partie consacrée au "priming"). Ainsi, NSF et ses adaptateurs SNAPs ne sont pas requis pour la fusion en elle-même, mais pour la dissociation (préalable et postérieure à la fusion) des complexes SNAREs formés en *cis*.

I.A.4.c.ii. Les SNAREs sont les cibles d'action des toxines clostridiales

L'importance fonctionnelle des SNAREs dans l'exocytose régulée a été démontrée par l'élucidation du mode d'action des toxines clostridiales botuliques et tétanique (issues de *Clostridium botulinum* et *Clostridium tetani*, respectivement ; Schiavo *et al.*, 1992; Schiavo *et al.*, 1994). Ces endopeptidases clivent les protéines SNAREs, entraînant une profonde inhibition de la sécrétion des hormones et des NT en empêchant la fusion vésiculaire (pour

une revue, voir Humeau *et al.*, 2000). La toxine tétanique (TeNT) est unique, alors qu'il existe plusieurs sérotypes de toxines botuliques (BoNT). Leur cibles d'action sont représentées sur la Figure 2. Ces toxines se sont révélées être des outils précieux pour la dissection des étapes moléculaires de l'exocytose.



I.A.4.c.iii. L'hypothèse SNARE en 1993 et aujourd'hui

I.A.4.c.iii.a. Les SNAREs comme déterminants de l'identité membranaire

Selon l'hypothèse SNARE formulée par Rothman et coll. en 1993, ce complexe aurait un rôle déterminant dans la reconnaissance des compartiments intracellulaires. L'appariement spécifique des SNAREs assurerait ainsi la spécificité des fusions entre organelles. Ceci était soutenu par le fait qu'il n'existe pas une seule protéine v- ou t-SNARE, mais des familles de protéines dont chacune a une localisation subcellulaire spécifique. Cette hypothèse est séduisante, mais sa valeur reste encore débattue.

En effet, certains arguments expérimentaux montrent que si les SNAREs ont un rôle majeur dans les phénomènes de fusion (voir plus bas dans ce chapitre), ils ne contiendraient pas toute l'information nécessaire à l'identité des membranes intracellulaires. Ainsi, les SNAREs ne possèdent qu'une spécificité relative, un v-SNARE donné pouvant s'apparier (*in vitro* et *in vivo*) avec plusieurs sortes de t-SNAREs, et réguler ainsi plusieurs étapes de fusion

(von Mollard *et al.*, 1997; Fasshauer *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999). Les v-SNAREs ne peuvent déterminer à eux seuls la destination d'une vésicule car ils sont recyclés après la fusion, via des vésicules qui ont une destination différente. De plus, les VS libèrent les NT à la zone active alors que la syntaxine et SNAP-25 sont présents sur toute la surface des neurones. Le groupe de Rothman, en revanche, montre grâce à un système de fusion *in vitro* de protéoliposomes, que si des interactions "non physiologiques" peuvent exister entre certains v- et t-SNAREs, celles-ci restent néanmoins improductives (Parlati *et al.*, 2000; Parlati *et al.*, 2002).

Ainsi, les SNAREs semblent capables d'apporter une information concernant l'identité des compartiments, même si la présence de facteurs régulateurs supplémentaires semble requise pour moduler ces interactions. Les résidus situés à la surface du complexe SNARE, et les régions des SNARE qui ne font pas partie du complexe peuvent participer à des interactions moléculaires qui contribueraient à la spécificité du trafic vésiculaire.

I.A.4.c.iii.b. Les SNAREs dans la phase d'arrimage

La deuxième proposition de l'hypothèse SNARE était la participation de ce complexe à la phase d'arrimage entre les membranes. Cette phase d'arrimage peut être définie d'un point de vue morphologique, comme correspondant à l'immobilisation des VS ou des GS au contact de la membrane plasmique (~8 nm de la membrane plasmique pour les VS). Cette étape semble pouvoir être fonctionnellement sub-divisée en deux parties.

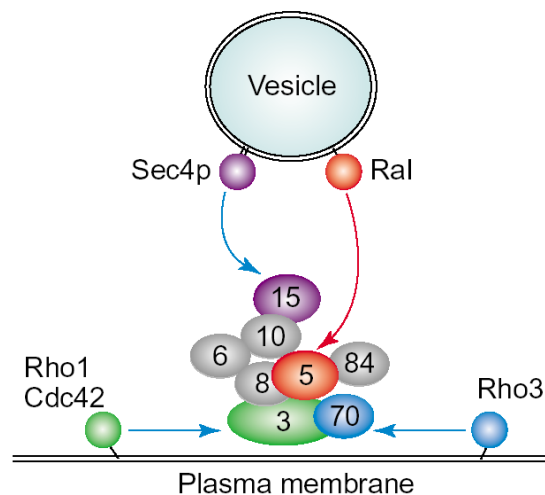
Le "tethering" serait la première phase de rapprochement entre les VS/GS et la membrane plasmique. Ce premier contact serait lâche et réversible (d'où le terme de *tethering*, de *tether* signifiant *longe* en anglais ; Ungermann *et al.*, 1998). L'étape suivante est le "docking", ou accostage, qui est beaucoup moins labile que la phase de *tethering*.

L'implication des SNAREs dans les étapes de tethering ou de docking semble improbable ; du moins, leur intégrité physique ne semble pas requise pour qu'elles puissent se produire. Ainsi, la délétion génique des SNAREs chez la drosophile (Broadie *et al.*, 1995) ne diminue pas le nombre de VS arrimées à la membrane plasmique, pas plus que leur clivage par les toxines clostridiales botuliques ou tétaniques (Hunt *et al.*, 1994), qui aurait même tendance à l'augmenter.

Quels seraient alors les acteurs moléculaires impliqués dans les étapes de tethering et de docking ? On vient de voir que le rôle des SNAREs est discuté. L'exocyste représente une alternative intéressante. Il s'agit d'un complexe de taille importante, composé de 8 protéines (pour des revues, voir Lipschutz *et al.*, 2002; Novick *et al.*, 2002; Short *et al.*, 2002) chez la levure et les mammifères. Ce volumineux assemblage moléculaire est limité aux zones d'exocytose chez la levure (TerBush *et al.*, 1996), et semble présent de manière précoce dans les synapses en formation (Hazuka *et al.*, 1999). Sec4p, une Rab présente sur les vésicules sécrétoires de levure, interagit avec Sec15p, un membre de l'exocyste (voir Figure 3). D'autres GTPases, telles que Ral, Rho1, Rho3 et Cdc42 interagissent également avec ce complexe, qui pourrait ainsi jouer un rôle de plateforme moléculaire recrutant des effecteurs variés, peut-être également impliqués dans des étapes postérieures au tethering. Le rôle de l'exocyste dans l'exocytose des NT reste à démontrer. Cependant, des travaux récents sur Ral ont montré que cette petite GTPase pouvait jouer un rôle dans le contrôle de la taille du pool libérable (Polzin *et al.*, 2002), selon un mécanisme encore incertain.

Figure 3

Résumé des interactions entre le complexe exocyste et des petites GTPases. Chez la levure, la protéine Rab Sec4p, présente sur les vésicules sécrétoires, interagit avec la protéine Sec15p de l'exocyste. Rho1 et Cdc42 interagissent avec Sec3p, tandis que Rho3 interagirait avec Exo70p. Chez les mammifères, Ral interagirait avec la protéine Sec5p de l'exocyste. Tiré de Novick *et al.*, 2002.



Munc18 est une autre protéine pour laquelle un rôle dans l'étape d'arrimage a été proposé. Munc18 (ou n-Sec1), l'homologue de mammifère de la protéine sec1 de levure, est une protéine cytosolique uniquement présente dans les terminaisons synaptiques. Munc18 aurait un rôle de protéine chaperon sur le tSNARE syntaxine, et permettrait sa sortie du réticulum endoplasmique (Rowe *et al.*, 2001). L'interaction de Munc18 sur la partie aminotermine de la syntaxine bloque cette dernière dans un état conformationnel incompatible avec son engagement au sein d'un complexe SNARE avec SNAP-25 et la VAMP (Dulubova *et al.*, 1999).

Chez la souris, la délétion génique de Munc18-1, une des isoformes de la famille Munc18, entraîne une diminution drastique (10 fois) du nombre de vésicules arrimées à la membrane plasmique (Voets *et al.*, 2001b), ainsi qu'une réduction comparable du nombre d'événements d'exocytose, mais dont les paramètres cinétiques restent inchangés, suggérant que Munc18 n'affecte pas les étapes finales de la libération.

Inversement, la surexpression de Munc18 augmente la taille du pool de vésicules arrimées. Cependant, le rôle de Munc18 dans le docking ne semble pas lié à son interaction fonctionnelle avec la syntaxine. Des données non publiées de E. Jorgensen indiquent aussi que chez *C. elegans*, le rôle de unc18 n'est pas limité au contrôle de l'assemblage des SNAREs. En effet, une forme constitutivement ouverte de syntaxine ne corrige pas le défaut observé en l'absence de unc18.

De plus, les données du groupe de Peter Novick (Grote *et al.*, 2000) qui montrent des quantités normales de complexes SNARE dans la lignée Sec1-1 et un blocage de la sécrétion suggèrent un rôle de sec1 en aval de la formation du complexe SNARE. Ces observations indiquent que les protéines de la famille sec1/Munc18, qui sont indispensables à la sécrétion, peuvent agir à plusieurs étapes : arrimage, amorçage et, peut-être, fusion.

I.A.4.c.iii.c. Les SNAREs dans la fusion membranaire

La dernière proposition de l'hypothèse SNARE est que ce complexe joue un rôle direct dans le mécanisme de la fusion des membranes cibles. C'est l'aspect le plus fécond de cette théorie. Ce point est discuté dans la partie spécifiquement consacrée à la fusion membranaire (voir plus bas).

I.A.4.d. La préparation fonctionnelle à la fusion – L'amorçage

L'organelle sécrétoire arrimée à la membrane plasmique est, d'un point de vue "géographique", arrivée au terme de son périple. Elle doit néanmoins subir un processus de maturation fonctionnelle qui la rend capable de fusionner. Si l'on peut faire, d'un point de vue fonctionnel, la différence entre un pool arrimé et mature et un autre arrimé mais immature, les mécanismes moléculaires de cette maturation ne sont pas encore tout à fait élucidés (pour une revue sur le *priming*, voir Klenchin *et al.*, 2000).

I.A.4.d.i. L'amorçage nécessite du Ca^{2+} et de l'ATP

Biochimiquement, on sait que cette étape nécessite la présence de Ca^{2+} et d'ATP (Holz *et al.*, 1989). Des études cinétiques réalisées dans les cellules chromaffines de la médullosurrénale par une stimulation rapide, non limitante, de la sécrétion (accroissement homogène rapide de $[Ca^{2+}]_i$ par photolyse d'un composant cagé) montrent que la réponse sécrétrice peut-être résolue en plusieurs phases distinctes. La phase rapide (première seconde) correspond à l'exocytose de vésicules préalablement arrimées à la membrane plasmique et fonctionnellement prêtes à fusionner, tandis que la phase lente (>1 sec) correspondrait au recrutement et à la maturation fonctionnelle d'un pool de vésicules immatures (de réserve).

I.A.4.d.ii. NSF dissocierait les cis SNAREs durant l'amorçage

D'un point de vue moléculaire, et au moins au sein de modèles cellulaires neuroendocriniens, elle correspond vraisemblablement à une réorganisation des interactions entre les différents acteurs impliqués. L'hydrolyse de l'ATP par NSF pourrait être nécessaire à la dissociation de complexes v/t-SNAREs formés en *cis* (Banerjee *et al.*, 1996), i.e. présents sur les GS et la membrane plasmique (Walch-Solimena *et al.*, 1995). Or ces complexes en *cis* ne peuvent jouer aucun rôle direct dans l'arrimage ou la fusion. Dans le cas de la fusion homotypique de vacuoles chez la levure, Sec18p (homologue de NSF) et Sec17p (homologue de α -SNAP) activent les SNAREs préalablement à l'arrimage et à la fusion (Nichols *et al.*, 1997). Chez la drosophile, le mutant *comatose* (mutation thermosensible de NSF) entraîne un blocage progressif de la libération de NT, et l'accumulation de complexes SNARE sur les VS (Littleton *et al.*, 1998). Le rôle de NSF serait de dissocier ces complexes en *cis* et de libérer les protéines SNAREs susceptibles de former un complexe en *trans* avec des SNAREs localisés sur une autre membrane. La fusion membranaire provoque un changement de topologie (fusion de 2 objets en un seul) qui se traduit, en ce qui concerne les complexes SNAREs, par un passage de la forme *trans* à la forme *cis*.

I.A.4.d.iii. Munc13 et la maturation des SNAREs

Munc13 est une protéine qui semble importante dans la phase d'amorçage, ou de "priming". C'est une protéine soluble mais néanmoins concentrée à la zone active, peut-être via son interaction avec RIM, un effecteur de Rab3 (voir la partie consacrée à Rab3). Elle contient des domaines C2 et un domaine C1 qui en fait une cible des esters de phorbols (Rhee

et al., 2002). L'inactivation du gène codant *unc13* (l'homologue de Munc13 chez *C. elegans*) provoque une altération sévère de la neurotransmission, malgré un arrimage apparemment normal des VS à la zone active (Koushika *et al.*, 2001), suggérant un défaut de l'amorçage en l'absence de *unc13*.

À l'inverse, la surexpression de Munc13 dans des cellules chromaffines bovines augmente considérablement la taille du pool de vésicules rapidement libérables (pool mature, constitué préalablement à la sécrétion) ainsi que la composante soutenue (maturation au cours de la sécrétion) sans affecter le nombre de vésicules arrimées à la membrane plasmique (Richmond *et al.*, 2001). Ces données suggèrent que Munc13 accélère la conversion d'un pool arrimé mais immature vers un pool pleinement compétent pour la fusion. Quel peut être le mécanisme moléculaire par lequel Munc13 contrôlerait l'amorçage ? Comme Munc18, Munc13 est capable d'interagir avec le fragment amino-terminal de la syntaxine, dont on pense qu'il jouerait un rôle auto-inhibiteur sur la formation du complexe SNARE (Nicholson *et al.*, 1998). Ainsi, on pense que Munc13 déplacerait Munc18 de l'extrémité N-terminale de la syntaxine, lui permettant alors d'adopter la configuration "ouverte" propice à la formation du complexe SNARE en *trans* (voir la Figure 5). De fait, les graves défauts d'amorçage observés chez les mutants de *unc13* chez *C. elegans* peuvent être totalement compensés par l'expression d'une forme constitutivement ouverte de la syntaxine (Richmond *et al.*, 2001), montrant que *unc13* agit en favorisant l'adoption d'une conformation compatible de celle-ci avec son engagement dans un complexe SNARE.

I.A.4.d.iv. Microdomaines lipidiques et phase d'amorçage

Outre son utilisation par NSF pour la dissociation des complexes SNAREs en *cis*, une part importante de l'ATP consommée durant l'amorçage pourrait également servir à la synthèse locale de phosphoinositides (par exemple, le phosphoinositide PI(4,5)P₂ depuis le phosphatidylinositol par la PI4K et la PI5K (Martin, 1998).

De nombreuses protéines impliquées dans l'exocytose peuvent fixer les phosphoinositides, par l'intermédiaire de domaines spécialisés, tels les domaines PH (Pleckstrin Homology), C2, FYVE (doigt à zinc) ou SH2 (voir Figure 4). De telles protéines sont des acteurs aussi importants que la synaptotagmine, le senseur calcique potentiel de l'exocytose, Munc-13 et la Rabphiline (qui sera décrite dans le chapitre consacré à Rab3), la

famille des Mints (interagissant notamment avec Munc18/n-Sec1), la famille DOC2, les protéines RIMs et Piccolo (des protéines de la zone active, probablement impliquées dans l'architecture de ce domaine).

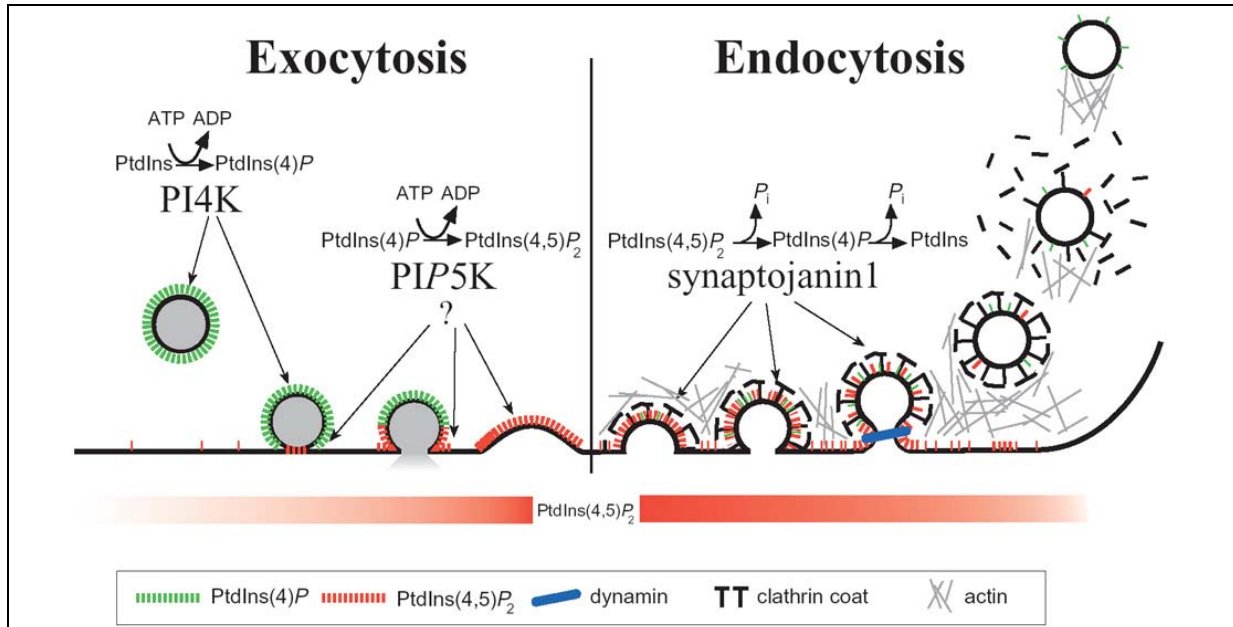


Figure 4

Implication des phosphoinositides dans la création de domaines lipidiques particuliers lors des phases d'exocytose et d'endocytose. Ces lipides particuliers, minoritaires dans l'ensemble des lipides membranaires, peuvent être localement produits par l'activité enzymatique des PI4K et PI5K (phosphorylations). À l'inverse, une déphosphorylation partielle des phosphoinositides interviendrait lors du processus d'endocytose. Issu de Cremona *et al.*, 2001.

Dans le cas de la synaptotagmine I et de la Rabphiline, la capacité de liaison des phosphoinositides croit fortement avec $[Ca^{2+}]_i$ (Voir Chung *et al.*, 1998 pour la Rabphiline, et Fernandez *et al.*, 2001 pour la synaptotagmine. Ceci pourrait avoir une grande importance dans le déclenchement du mécanisme de fusion membranaire (voir plus bas dans cette introduction).

I.A.4.d.v. Le "serré" et le "relâché"

Des arguments expérimentaux solides montrent qu'il existerait une distinction au sein des VS/GS matures, prêts à libérer leur contenu lors de la survenue de l'influx calcique. Ces états se distingueraient notamment par leur accessibilité à des anticorps dirigés contre des parties centrales du "core complex" (Xu *et al.*, 1999), et également par leur sensibilité aux neurotoxines clostridiales, et correspondraient à des états d'association plus ou moins

complets du complexe SNARE en *trans*. *In vitro*, et en l'absence d'ancrage membranaire, aucune contrainte ne s'oppose à la formation d'un complexe "serré". En revanche, dans le cas d'un complexe en *trans* (SNAREs en opposition sur leurs membranes respectives), les répulsions des membranes constituent un obstacle à l'appariement complet des motifs SNAREs.

Une inter-conversion permanente aurait lieu au repos entre ces deux états (voir Figure 5). L'état insensible aux toxines correspondrait à l'état d'association forte (basse énergie) et à un pool très rapidement libérable (composante rapide du pool immédiatement libérable dans les cellules chromaffines, libéré en 30 msec). Le pool mature sensible aux toxines ou aux anticorps correspondrait à la partie "lente" de ce même pool (libérable en 300 msec) (Xu *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1999). Voir également Voets *et al.*, 1999; Voets, 2000 pour une discussion sur les phases de la sécrétion dans le modèle des cellules chromaffines.

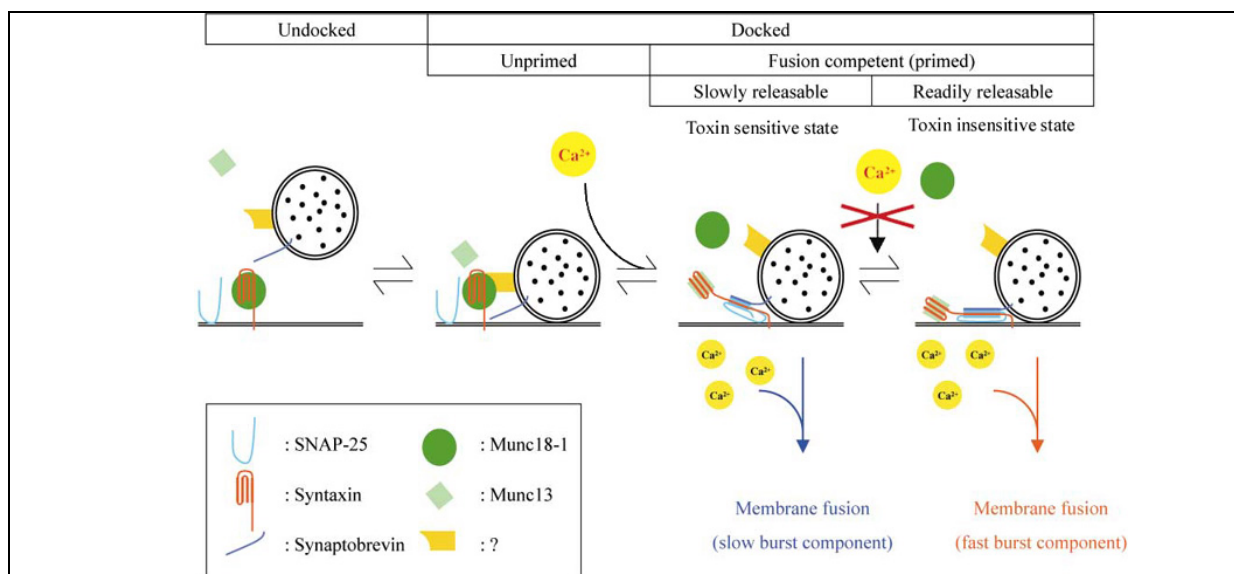


Figure 5

Les différentes phases aboutissant à l'exocytose d'une VS. Le passage de l'état arrimé mais non amorcé ("docked/unprimed") à l'état amorcé ("primed") nécessite du Ca^{2+} et de l'ATP. Les deux états de maturation seraient discernables par la sensibilité aux toxines clostridiales et leur accessibilité à des anticorps dirigés vers les motifs SNARE, traduisant des états d'association différents des complexes SNAREs formés en *trans*. Ces pools ont des capacités distinctes en terme de cinétique de libération. Munc18-1 est une protéine chaperon de la syntaxine, qui la maintiendrait dans un état replié indisponible pour la formation du complexe *trans*. Munc13, autre chaperon de la syntaxine, aiderait celle-ci à adopter sa configuration "ouverte", réceptive pour la formation du complexe SNARE. Modifié de Voets *et al.*, 2001b et Voets, 2000.

I.A.4.e. Le déclenchement de la fusion - Rôle du calcium

La sensibilité au Ca^{2+} de l'exocytose est connue depuis la fin des années 1960 par les travaux de Douglas et coll. Néanmoins, son mécanisme d'action précis sur la machinerie de sécrétion n'est toujours pas élucidé. Dans le neurone, le calcium provient majoritairement de l'extérieur de la cellule, par l'ouverture de canaux calciques N ou P/Q lorsque le potentiel d'action arrive à la pré-synapse (pour une revue sur les mécanismes d'action du Ca^{2+} , voir (Augustine, 2001)). Dans la cellule chromaffine, la situation est différente, à plusieurs points de vue. D'une part, les canaux calciques impliqués sont de type P/Q (comme dans le neurone), mais les canaux de type L (sans rôle majeur dans le neurone) pourraient jouer ici un rôle important (Artalejo *et al.*, 1994); les canaux de type R semblent également impliqués, en particulier dans les phases rapides de la sécrétion (Albillos *et al.*, 2000). D'autre part, si l'afflux de calcium primaire provient bien de l'ouverture des canaux calciques membranaires, la libération secondaire depuis des stocks intracellulaires de calcium (réticulum endoplasmique, et peut-être les GS eux-mêmes) jouerait un rôle important dans le maintien d'une sécrétion soutenue sur des périodes longues, durant lesquelles les canaux calciques de la membrane plasmique peuvent s'inactiver.

I.A.4.e.i. Architecture des domaines calciques

La libération de NT ou d'hormone après l'entrée du Ca^{2+} n'est pas immédiate. Il existe un délai (latence) qui sépare l'entrée de calcium et les premiers événements d'exocytose. Ce délai est variable, mais reste extrêmement bref dans les neurones (de l'ordre de 100 μsec) et est considérablement plus long dans les cellules chromaffines, de 5 à 50 msec (Chow *et al.*, 1992). Ce délai recouvre de nombreuses étapes distinctes, et de légères différences pour chacune pourraient expliquer cet écart (propagation du potentiel d'action à la pré-synapse, ouverture des canaux ioniques, action du Ca^{2+} sur le(s) senseur(s) calcique, etc). Cependant, les machineries moléculaires de sécrétion dans les deux types cellulaires présentent de très grandes similitudes, et il est vraisemblable qu'au moins une partie de cet écart est due à des architectures différentes des sites de libération, notamment au niveau des domaines calciques (Chow *et al.*, 1994).

Physiologiquement, ces différences peuvent trouver une justification. Une transmission performante et synchrone de l'information nerveuse se doit d'être extrêmement

rapide. En revanche, la réponse hormonale et certains cas de décharge neuronale n'ont pas cet impératif de vitesse, même si le phénomène reste tout de même rapide comparé à d'autres processus biologiques (~10 msec). Le délai beaucoup plus bref observé dans le neurone pourrait notamment être dû à une meilleure co-localisation des sites d'entrée du calcium et de libération, même si une grande hétérogénéité semble exister au sein des modèles neuronaux. Ainsi, la dépendance au Ca^{2+} dans la synapse en calice de Held n'est que de quelques μM (Schneeggenburger *et al.*, 2000), tandis qu'elle atteint plusieurs centaines de μM dans les neurones bipolaires de la rétine du poisson rouge (Heidelberger *et al.*, 1994).

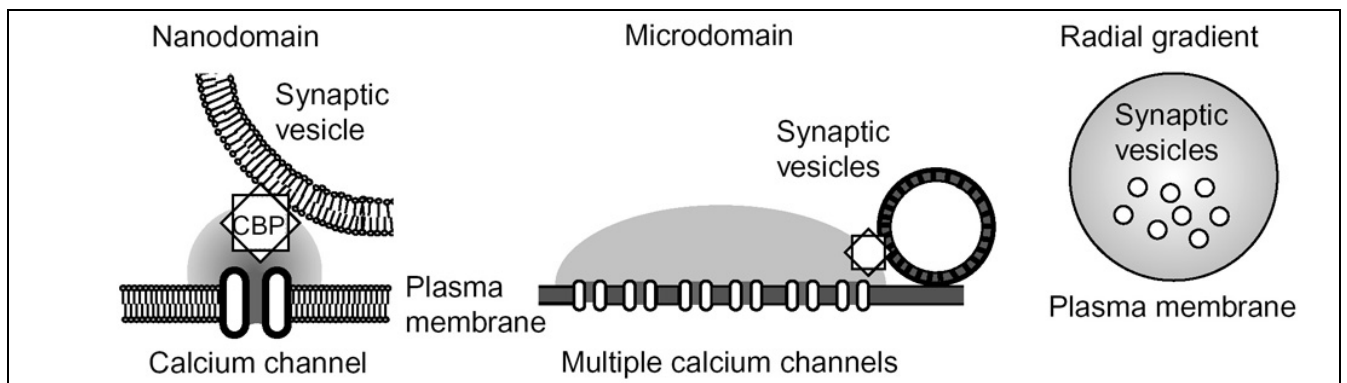


Figure 6

Les 3 types de "domaines" calciques. L'extrême colocalisation des canaux calciques et des sites de libération au sein d'un nanodomaine permettrait d'assurer une libération rapide et un excellent couplage stimulus/libération. La faible distance entre le point d'entrée du Ca^{2+} et ses cibles expliquerait l'inefficacité de tampons lents, comme l'EGTA, à inhiber la sécrétion. L'organisation en microdomaines, où plusieurs canaux contribueraient à créer une zone plus étendue et plus distante des VS/GS, permettant la chélation du Ca^{2+} par des tampons lents. Dans les cellules neuroendocrines, enfin, les domaines calciques seraient beaucoup plus étendus, même si une certaine régionalisation est observée, regroupant canaux calciques et sites de libération dans une même zone de la cellule. Illustration tirée de (Augustine, 2001).

L'idée d'une architecture fonctionnelle permettant un couplage efficace dans certaines synapses par rapprochement des sites d'influx calcique et de libération (au sein de "nanodomaines" calciques, de l'ordre de quelques nanomètres de diamètre, voir Figure 6) est confortée par différents arguments : à la synapse géante de calmar, par exemple, des chélateurs rapides du Ca^{2+} (comme le BAPTA) bloquent efficacement la libération de NT, tandis que des chélateurs lents (EGTA) ont beaucoup moins d'effet (Adler *et al.*, 1991). Ceci est également observé dans les neurones bipolaires de la rétine du poisson rouge (von Gersdorff *et al.*, 1996), et à la JNM de grenouille (Robitaille *et al.*, 1993).

En revanche, à la synapse en calice de Held (Borst *et al.*, 1996) et dans le neurone cholinergique d'Aplysie (Doussau *et al.*, 1998), l'EGTA inhibe efficacement la sécrétion,

indiquant une plus grande distance entre influx calcique et site de libération (microdomaines calciques, plus étendus -quelques dizaines de nanomètres- que les nanodomaines proposés pour les autres modèles ; pour une revue, voir (Augustine, 2001).

L'idée de régions spécifiques regroupant canaux calciques et sites de fusion est renforcée par la possibilité de co-purifier des canaux calciques et certains composants de la machinerie de sécrétion, comme la syntaxine (Bennett *et al.*, 1992) ou la synaptotagmine (Leveque *et al.*, 1992).

Dans les cellules neuroendocrines, les zones d'entrée du calcium et de libération ne sont pas réparties de manière homogène sur l'ensemble de la surface cellulaire (Schroeder *et al.*, 1994). Néanmoins, si certains arguments (Robinson *et al.*, 1995) montrent également qu'il existe aussi un certain degré de colocalisation entre canaux calciques et libération dans les cellules chromaffines, on semble loin d'une organisation en nanodomaines calciques (voir Mansvelder *et al.*, 2000 pour une revue). Les domaines calciques seraient, dans le cas des cellules neuroendocrines, beaucoup plus étendus (plusieurs centaines de nanomètres), expliquant des temps de latence élevés dans ces cellules, et le très fort effet inhibiteur de tampons lents tels l'EGTA.

Enfin, la contribution de stocks intracellulaires de calcium (réticulum), activés par des seconds messagers (comme l'IP3, ou le Ca^{2+} lui-même) pourrait jouer un rôle dans ces cellules pour les phases soutenues de sécrétion. Cet aspect sera abordé dans la discussion sur Rab3 et sa liaison aux mécanismes de la dépendance de l'exocytose vis-à-vis du calcium.

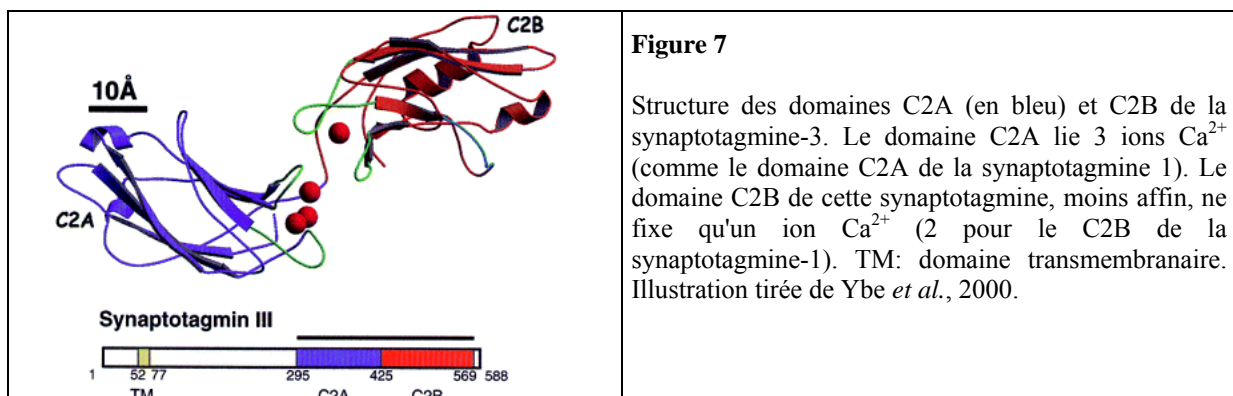
I.A.4.e.ii. La synaptotagmine est-elle le senseur calcique de l'exocytose ?

La question de l'identité du senseur moléculaire du calcium pour le processus sécrétoire est toujours un sujet de débat. Néanmoins, un grand nombre d'arguments désigne la synaptotagmine pour ce rôle. La synaptotagmine, ou plutôt les synaptotagmines (13 isoformes connues en 2002), sont des protéines intégrales des VS et des GS (Perin *et al.*, 1990) mais également de la membrane plasmique. On notera que différentes synaptotagmines, exprimées dans des cellules PC12 adoptent des localisations distinctes et que certaines isoformes semblent spécifiquement associées à certains compartiments cellulaires (Saegusa *et al.*, 2002; Sugita *et al.*, 2002) ; pour une revue, voir Marqueze *et al.*, 2000.

Ces protéines comportent deux domaines C2 (C2A et C2B) dans leur partie carboxyterminale qui peuvent fixer chacun plusieurs ions Ca^{2+} (3 ions Ca^{2+} pour C2A de la synaptotagmine-1 selon Ubach *et al.*, 1998, et 2 pour le C2B, Fernandez *et al.*, 2001). Les fonctionnalités de ces deux domaines semblent différentes (voir plus loin). Les affinités de liaison du Ca^{2+} sont de l'ordre de 3-30 μM en présence de phospholipides, ce qui est comparable avec l'affinité du senseur calcique pour la phase rapide de l'exocytose (Schneppenburger *et al.*, 2000).

Chez la souris, la suppression du gène codant la synaptotagmine-1 entraîne la mort des animaux hétérozygotes peu de temps après la naissance. On observe chez ces mutants une altération spécifique de la phase synchrone de la sécrétion dans des neurones d'hippocampe (Geppert *et al.*, 1994b; Yoshihara *et al.*, 2002). De plus, Fernandez-Chacon et coll. ont identifié des mutations du domaine C2A qui diminuent l'affinité pour le Ca^{2+} de moitié. Le remplacement du gène de la synaptotagmine-1 par une copie portant cette mutation diminue la sensibilité au Ca^{2+} de la machinerie d'exocytose par un facteur 2 (Fernandez-Chacon *et al.*, 2001).

Chez les souris synaptotagmine-1 $-/-$, on observe une disparition de la phase rapide du pool immédiatement libérable dans les cellules chromaffines (Voets *et al.*, 2001a). Étonnamment, les composantes lentes de la réponse ne sont pas affectées par l'absence de la synaptotagmine-1, mais de fortes suspicions pèsent sur d'autres isoformes de la famille pour être les senseurs calciques de ces composantes, en particulier en raison de la bonne adéquation entre leur affinité mesurée pour le Ca^{2+} et l'affinité apparente des phases lentes pour cet ion (Voets, 2000; Sugita *et al.*, 2002). De plus, les domaines C2 des isoformes 3 et 7 inhibent fortement la sécrétion de cellules PC12 sur des temps longs, indiquant un rôle dans les phases lentes de la sécrétion (Shin *et al.*, 2002; Sugita *et al.*, 2002).



I.A.4.e.ii.a. Insertion membranaire et oligomérisation de la synaptotagmine

En présence de Ca^{2+} , les domaines C2 de la synaptotagmine peuvent se lier aux membranes contenant des phospholipides acides et s'insérer partiellement dans la bicouche. Davis et coll. ont démontré que cette insertion était extrêmement rapide (de l'ordre de la milliseconde, Davis *et al.*, 1999), et qu'elle ne fait pas appel à un changement conformationnel véritable (qui existe cependant, mais qui est assez minime) mais plutôt à un déplacement du potentiel électrostatique, induit par une liaison entre 2 boucles du domaine C2A via un ion Ca^{2+} , provoquant l'insertion dans la membrane (Sutton *et al.*, 1995; Shao *et al.*, 1996; Shao *et al.*, 1997). Alors qu'on pensait initialement que cette liaison requérait de faibles ($\sim 5 \mu\text{M}$) concentrations de Ca^{2+} , des données plus récentes indiquent une gamme plus élevée, de 20 à 70 μM (Davis *et al.*, 1999). Le domaine C2A, et plus particulièrement sa capacité de liaison aux phospholipides, est-il important pour la fonction de la synaptotagmine dans l'exocytose des NT ? Des mutations diminuant fortement l'affinité du domaine C2A isolé pour le Ca^{2+} et les phospholipides *in vitro*, n'ont que peu d'effet sur la sécrétion de NT chez la souris (Fernandez-Chacon *et al.*, 2002). Il semblerait en fait que les domaines C2A et C2B constituent une entité fonctionnelle possédant une certaine coopérativité, de sorte que des modifications importantes pour un domaine isolé soient partiellement compensables lorsque les deux domaines sont présents.

Le domaine C2B jouerait également un rôle majeur dans la formation d'homo- ou d'hétéro-oligomères de synaptotagmines, que l'on pense être importants pour la fonction de ces protéines (Wu *et al.*, 2003). De fait, il a été montré que la mutation AD3 dans le domaine C2B empêchant l'oligomérisation de la synaptotagmine était létale chez les animaux homozygotes (Fukuda *et al.*, 2000). Cette oligomérisation semble être régulée par le calcium. Dans le cas de la fixation de synaptotagmine-1 sur la synaptotagmine-2 par exemple, 50% d'association sont observés en présence de 100 μM de Ca^{2+} . Alors que Davis et coll. ont montré que l'insertion du domaine C2A dans les membranes ne nécessitait pas de changement conformationnel de ce domaine, celui-ci serait requis pour l'oligomérisation via les domaines C2B induite par le Ca^{2+} .

I.A.4.e.ii.b. Liaison de la synaptotagmine aux SNAREs et à d'autres partenaires

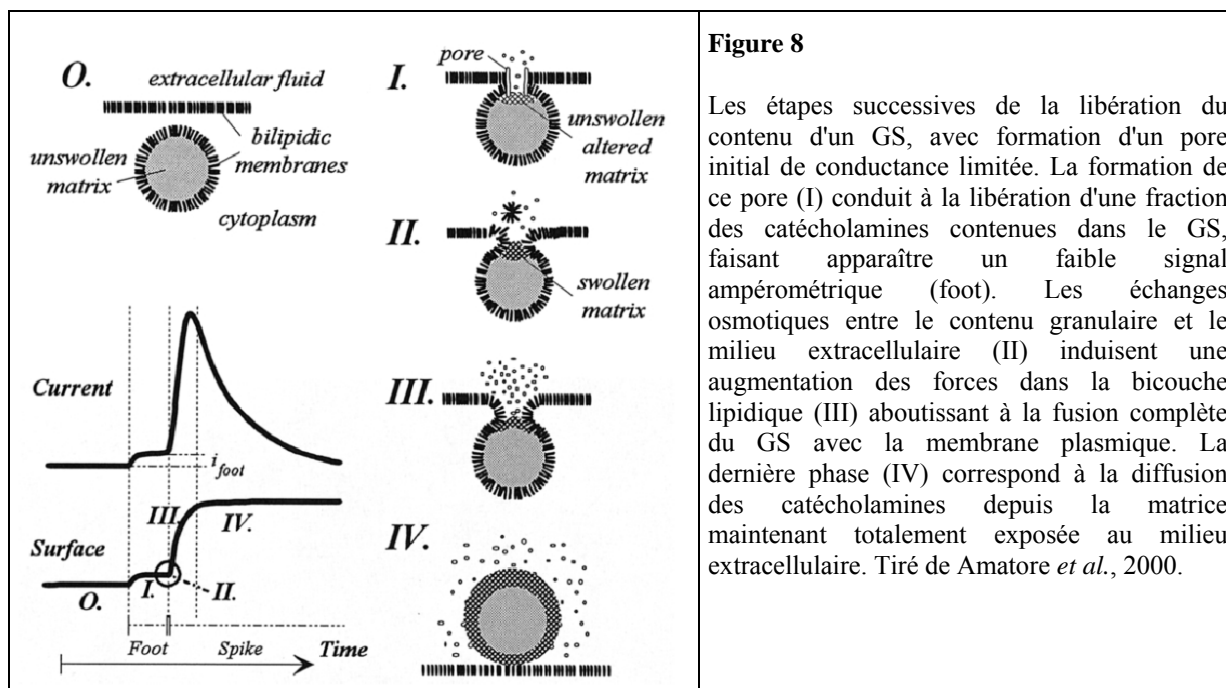
Ainsi, la synaptotagmine semble jouer un rôle important dans la sensibilité de l'exocytose au Ca^{2+} . Par quel mécanisme cette protéine peut-elle interagir avec la machinerie de fusion ? Il a été démontré que la synaptotagmine interagit avec les SNAREs (Bennett *et al.*, 1992; Sollner *et al.*, 1993a), de manière dépendante du Ca^{2+} (Chapman *et al.*, 1995). Il est proposé que cette association entre la synaptotagmine et les SNAREs renforce l'état d'association tendue des complexes SNAREs en *trans*, facilitant leur rôle dans la fusion. Un modèle intégrant la synaptotagmine au complexe SNARE est proposé par Lentz *et al.*, 2000 (voir Figure 11). Enfin, le motif C2B des synaptotagmines possède également la capacité de lier d'autres molécules, comme l'adaptateur de clathrine AP2, suggérant un rôle dans le couplage exocytose/endocytose pour les synaptotagmines (Zhang *et al.*, 1994). De plus, des mutants tronqués de leur domaine C2B perdent leur interactions avec AP2 et perturbent l'endocytose (Littleton *et al.*, 2001).

I.A.4.f. La fusion membranaire. Le pore de fusion

La nature de ce pore de fusion, et les modalités biophysiques de sa formation, reste encore assez débattue. Deux hypothèses ont été proposées.

I.A.4.f.i. Le pore de fusion lipidique

In vivo, de nombreuses données montrent que la fusion des VS/GS avec la membrane plasmique s'accompagne de la formation d'un pore de fusion transitoire. Les mesures de capacité membranaire sur des cellules chromaffines bovines montrent l'existence d'un pore de conductance limitée (~ 500 pS), qui peut osciller (*flicker*) avant une expansion brutale (Albillos *et al.*, 1997). Le diamètre initial de ce pore, avant son expansion, est estimé à $\sim 2,5$ nm dans ce système. La mesure simultanée des catécholamines par ampérométrie montre que la libération débute en même temps que l'ouverture du pore, qui est ainsi capable de laisser diffuser une fraction du contenu des GS (*foot*). Cette diffusion s'accompagne d'échanges ioniques entre le milieu extracellulaire et le contenu granulaire, entraînant un gonflement osmotique de la matrice polyélectrolytique (voir Figure 8). C'est ce gonflement qui induit une importante augmentation de la tension de surface du GS, entraînant une dilatation irréversible du pore, la fusion complète avec la membrane plasmique et la libération de la totalité du contenu granulaire (pour une revue, voir Amatore *et al.*, 2000).

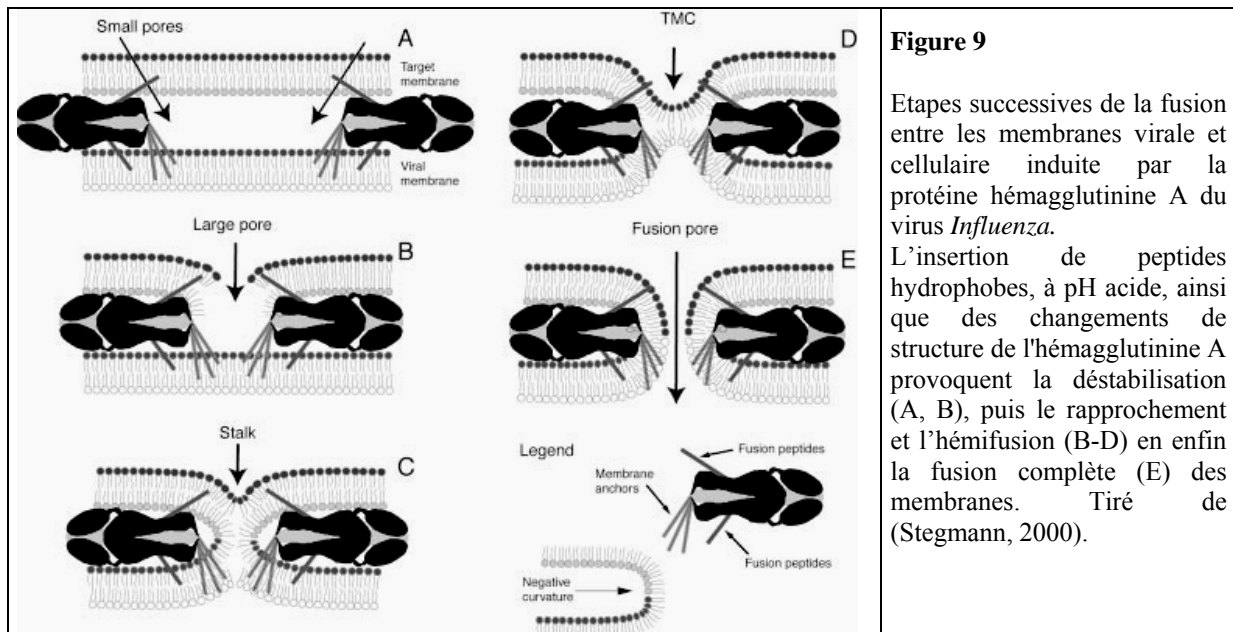


Des études *in vitro*, à l'aide de bicouches constituées de lipides purs (i.e. sans protéine), montrent l'existence de tels pores fluctuants (Chernomordik *et al.*, 1987; Chanturiya *et al.*, 1997). La fusion de bicouches lipidiques implique la formation d'états intermédiaires où des courbures importantes des membranes à fusionner sont observées (*stalk hypothesis*). Chernomordik et coll. montrent que la fusion de membranes constituées de lipides purs peut être influencée par la géométrie des lipides mis en présence, facilitant ou défavorisant la formation de l'état intermédiaire (*stalk*, ou pédoncule ; Chernomordik *et al.*, 1995) (voir Figure 10 et Figure 11). Néanmoins, si un pore lipidique peut se former entre 2 membranes suffisamment proches, les forces de répulsion entre les têtes chargées des lipides s'opposent à leur rapprochement. Quels sont alors, dans les cellules, les mécanismes permettant ce rapprochement ?

I.A.4.f.i.a. Les protéines fusogènes virales

L'étude du mécanisme utilisé par le virus *influenza* pour promouvoir sa fusion avec la cellule hôte a fait progresser notre connaissance des mécanismes de la fusion membranaire. Le mécanisme repose sur le rapprochement des membranes par l'hémagglutinine A (voir Figure 9). À faible pH, un "peptide de fusion" hydrophobe est exposé à la surface de l'hémagglutinine A, et s'insère dans les membranes virale et cellulaire. Des modifications de

la conformation de la protéine (apparition de structures en "coiled-coil") induisent ensuite un rapprochement et une déstabilisation des membranes aboutissant à leur fusion.



I.A.4.f.i.b. Rôle des SNAREs dans la fusion membranaire

De manière similaire, les SNAREs pourraient rapprocher les membranes lipidiques pour favoriser la fusion (voir Figure 10). En effet, il est possible de faire fusionner des liposomes artificiels (ne contenant pas de lipide de géométrie particulièrement favorable) par la seule présence des SNAREs, bien que le processus soit dans ces conditions bien trop lent pour rendre compte des phénomènes biologiques (Weber *et al.*, 1998; Parlati *et al.*, 2002). L'action synergique des SNAREs et de l'accumulation locale de lipides induisant des courbures favorables des membranes semble requise pour un processus efficace de fusion. Ainsi, la conversion de l'acide lysophosphatidique (LPA) en acide phosphatidique (PA) par l'endophiline favorise l'invagination de la membrane plasmique lors de l'endocytose (Schmidt *et al.*, 1999), le phénomène "symétrique" de l'exocytose. De même, la conversion de la phosphatidylcholine (PC) en PA par la phospholipase D (PLD) favorise la fusion des VS ou des GS avec la membrane plasmique (Humeau *et al.*, 2001b; Vitale *et al.*, 2001).

On notera cependant les contradictions apportées par des études démontrant que les complexes en *trans* semblent pouvoir se dissocier bien avant (plusieurs heures) la fusion des vacuoles dans la levure (Ungermann *et al.*, 1998). La même observation est faite pour

l'exocytose des granules corticaux d'œuf d'oursin (Coorsen *et al.*, 1998; Tahara *et al.*, 1998). Ce dernier groupe propose pour le complexe SNARE un rôle de stabilisation du *docking*, et de recrutement d'autres facteurs qui catalyseraient ensuite la fusion (Zimmerberg *et al.*, 2000). L'inactivation des gènes codant VAMP2 (Schoch *et al.*, 2001) ou SNAP-25 (Washbourne *et al.*, 2002) induisent des défauts sévères de la libération des NT en réponse à un stimulus. Cependant la fréquence des événements de fusion spontanés (miniatures) est normale dans les souris SNAP-25 *-/-*, et diminuée 10 fois dans les souris déficientes en VAMP2. Ces résultats pourraient suggérer que les SNAREs ne sont pas absolument nécessaires pour la fusion membranaire; cependant, l'existence de mécanismes compensatoires est envisageable, dans la mesure où plusieurs isoformes de chaque protéine du complexe SNARE existent (par exemple, on connaît au moins deux isoformes neuronales de SNAP-25, sans compter que SNAP-23 pourrait également jouer un rôle dans le processus d'exocytose (Sorensen *et al.*, 2003).

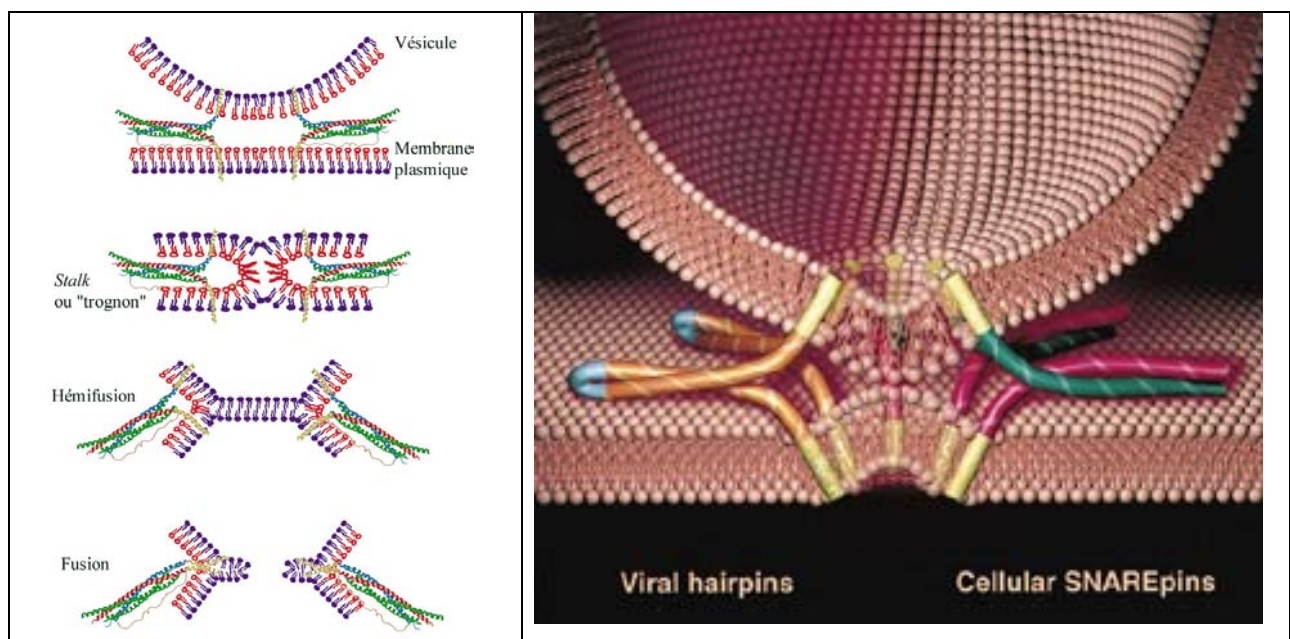


Figure 10

À gauche : rôle mécanique des SNAREs proposé dans le rapprochement des membranes vésiculaire et plasmique. On constate la grande analogie avec le modèle de fusion membranaire induite par l'hémagglutinine de *Influenza* (Figure 9). Adapté de (Brunger, 2000). À droite : analogie entre les mécanismes d'actions des molécules fusogènes virales telle l'hémagglutinine A (partie gauche) et les SNAREs (à droite). L'action de ces protéines aboutirait à la fusion des membranes après un rapprochement suffisant. Illustration tirée de Weber *et al.*, 1998.

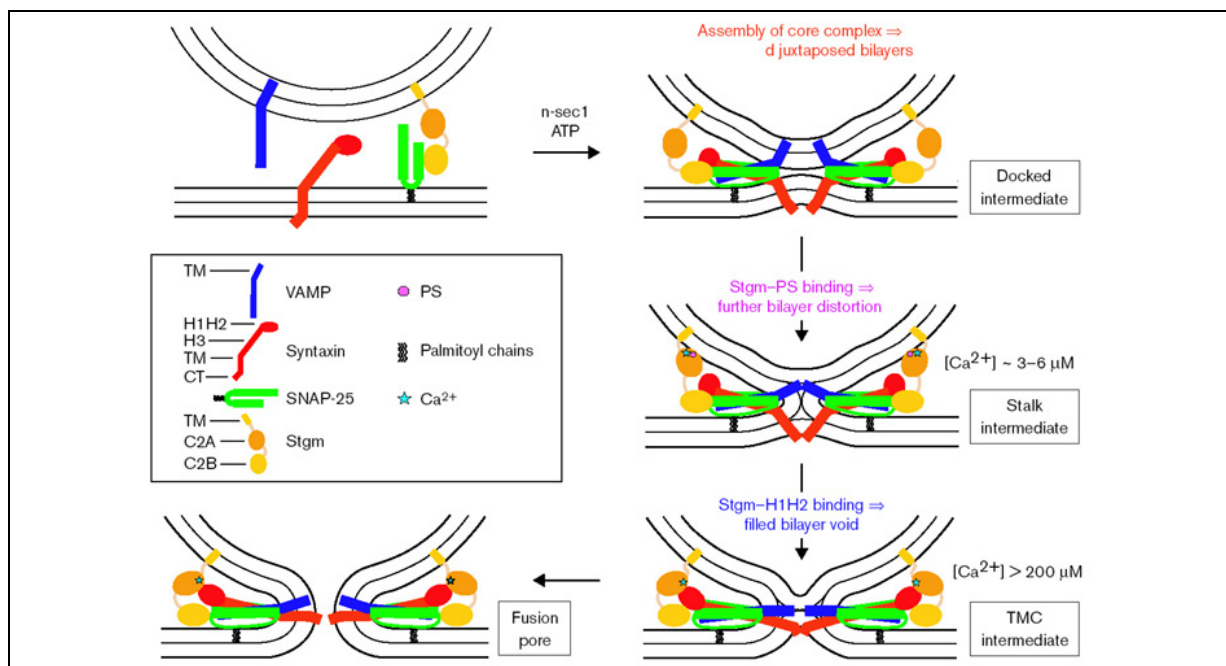


Figure 11

Modèle incorporant le rôle des SNAREs et de la synaptotagmine dans le mécanisme de fusion membranaire. L'association en *trans* des SNAREs amènerait les membranes au contact, mais de manière trop lente pour fusionner. La synaptotagmine, en réponse à l'élévation de Ca^{2+} cytosolique, lierait les phospholipides et amènerait un changement supplémentaire de conformation du "core complex", stabilisant la formation du pédoncule de membranes et entraînant la formation du pore de fusion. Modèle proposé par Lentz *et al.*, 2000.

I.A.4.f.ii. Pore protéo-lipidique : l'hypothèse V0

Les travaux récents de Peters et coll. ont ranimé le débat sur le concept du médiatophore, développé il y a 16 ans par le groupe de Maurice Israël (Israel *et al.*, 1987) pour la libération d'ACh à la jonction neuromusculaire du poisson torpille. Pour une revue sur l'implication du médiatophore dans la libération de NT, voir Dunant *et al.*, 2000.

Peters et coll. ont proposé que la sous-unité V_0 de l'ATPase vacuolaire, présente sur beaucoup d'organites intracellulaires, joue un rôle dans la catalyse de la fusion vacuolaire chez la levure (Peters *et al.*, 2001). Dans le modèle proposé, un pore protéolipidique serait formé par l'accolement en *trans* de deux segments V_0 (voir Figure 12). Le modèle impliquant V_0 n'exclut pas l'intervention du complexe SNARE ; dans le modèle de la levure, l'appariement en *trans* des SNAREs est requis, mais ils semblent agir à un stade précoce et se dissocier avant que la fusion ne se produise. L'association physique entre V_0 et les SNAREs (Galli *et al.*, 1996) suggère également une interaction fonctionnelle entre ces acteurs.

Le pore formé serait ensuite dissocié, selon un mécanisme encore inconnu, qui pourrait impliquer la diffusion radiale des hexamères constituant chaque segment V_0 (voir Figure 12), mais un tel mécanisme de dissociation des sous-unités aurait un coût énergétique sans doute important : on sait en effet que le complexe V_0 peut maintenir son intégrité dans la membrane malgré les vitesses de rotation élevées qui sont atteintes lorsqu'il fonctionne comme pompe à protons en association avec le secteur V_1 . Chez la levure, ce processus dépendrait également de l'implication de la calmoduline et de la protéine phosphatase I (PP1) (Peters *et al.*, 1998; Peters *et al.*, 1999).

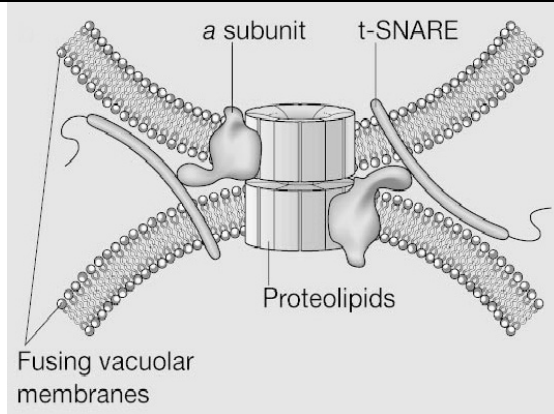
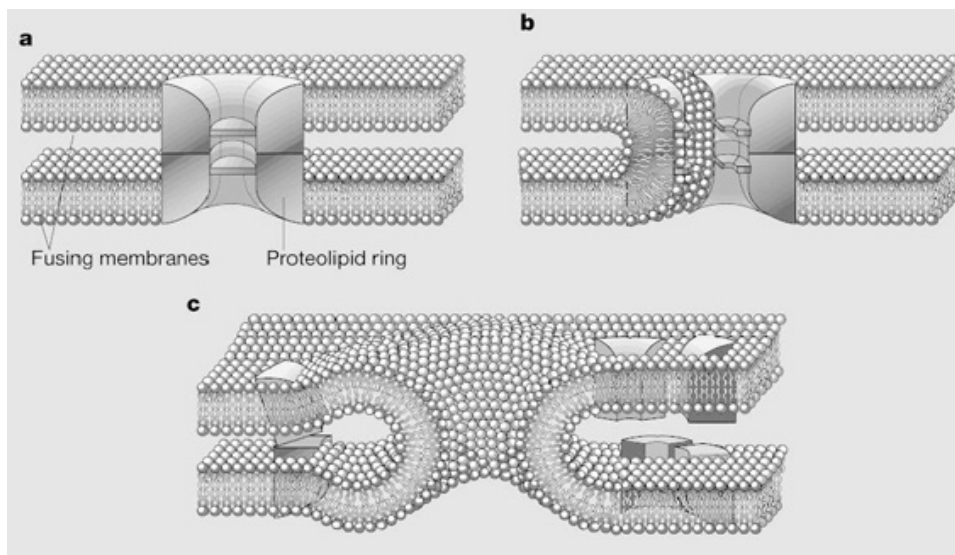


Figure 12

Panneau de gauche : modèle d'un pore protéolipidique constitué par l'accolement de deux segments V_0 de l'ATPase vacuolaire.

Le segment V_0 , constitué de 6 sous-unités (4c, c', c'') constitue la partie canal de l'ATPase/pompe à protons.

Panneau du bas : modèle de dissociation du pore protéolipidique. Après la juxtaposition des 2 segments V_0 , il est proposé que les hexamères les constituant s'écartent de manière radiale pour permettre l'insertion de lipides membranaires selon un mécanisme inconnu. Illustrations tirées de (Almers, 2001).



I.A.4.g. Le recyclage des VS – L'endocytose

Dans le cas d'une VS ou d'un GS fusionnant totalement avec la membrane plasmique, ses constituants membranaires sont recyclés par la voie de l'endocytose. Ce terme général recouvre en fait plusieurs phénomènes, dont la complexité moléculaire en font un sujet sans doute aussi vaste que l'exocytose. Ainsi, je ne présenterai que quelques points illustrant l'endocytose par les puits recouverts de clathrine, qui est le premier mode décrit.

Celui-ci ne se ferait pas directement au site de fusion (i.e. la zone active) mais plutôt en périphérie de celle-ci. La formation des puits recouverts de clathrine fait probablement intervenir des microdomaines membranaires de composition particulière, nommés *rafts* (radeaux). Les propres constituants de la VS ou du GS incorporés lors de la fusion avec la membrane plasmique seraient des acteurs importants dans la constitution de ces domaines. En particulier, le cholestérol (abondant dans les VS) et surtout les phosphoinositides formés lors des phases de préfusion (vraisemblablement lors du *priming*) pourraient servir à recruter la machinerie d'endocytose. Les constituants du manteau AP2, en particulier, peuvent lier les phosphoinositides, et également certaines protéines de l'ex-VS/GS, comme la synaptotagmine (Jorgensen *et al.*, 1995; Haucke *et al.*, 2000). L'invagination de la membrane impliquerait la formation d'un manteau formé à partir des triskélions de clathrine, aidée par l'action régulatrice de la protéine AP180 (Zhang *et al.*, 1998; Nonet *et al.*, 1999). Le rôle de la GTPase dynamine serait, par une constriction mécanique du "cou" de la membrane invaginée, d'aider à sa fission (Sweitzer *et al.*, 1998; Sever *et al.*, 2000). Les modalités de cette constriction restent débattues. En particulier, la possibilité que la dynamine n'intervienne pas dans un rôle mécanique, mais plutôt comme recruteur d'effecteurs est sujet à débat (Sever *et al.*, 1999; Marks *et al.*, 2001a). Dans la suite du cycle, le manteau AP2/clathrine serait dissocié avec l'aide de protéines auxiliaires, comme l'auxiline et le chaperon Hsp70. Après acidification par la V-ATPase et remplissage par les transporteurs de NT, la VS serait réincorporable aux pools libérables (voir Figure 13).

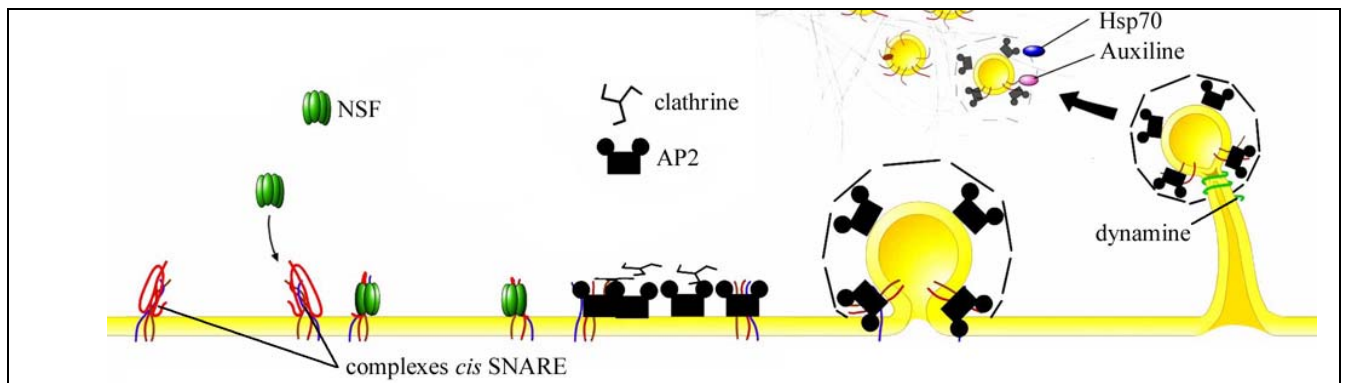


Figure 13

Les étapes de l'endocytose par la formation de puits recouverts de clathrine. Les complexes *cis* SNAREs présents après la fusion de la VS avec la membrane plasmique sont dissociés par l'action de NSF. La zone de membrane contenant les "restes" de la VS fusionnée possède une composition lipidique (phosphoinositides, cholestérol) et protéique (équipement membranaire de l'ex VS) particulière, qui comporte des signaux de recrutement pour la machinerie d'endocytose, composée des protéines adaptatrices AP2, puis des triskélions de clathrine. De même que certains lipides favorisent la fusion, le phénomène de fission fait probablement intervenir de nouveau des lipides particuliers, produits par des activités enzymatiques dédiées, comme l'endophiline (Schmidt *et al.*, 1999). L'invagination et la fission sont aidées par la dynamine, une GTPase auto-assemblée. Son rôle (étranglement mécanique, ou signalisation pour d'autres effecteurs) reste débattu. Le manteau AP2/clathrine serait dissocié par les protéines Auxilin et Hsp70. Illustration modifiée de Galli *et al.*, 2001.

I.B. Conclusion et but du travail

Les étapes du cycle menant de la formation d'une VS ou d'un GS à sa fusion puis à son recyclage sont nombreuses et complexes. L'unité UPR 1929 du CNRS dans laquelle j'ai effectué mon travail de thèse étudie plusieurs aspects de ce cycle, des mécanismes du remplissage vésiculaire (équipe de Bruno Gasnier) aux mécanismes de l'endocytose (équipe d'Anne Schmidt), en passant par l'analyse des mécanismes de fusion membranaire (équipe de Jean-Pierre Henry) et l'étude du rôle des protéines Rab dans ce cycle (équipe de François Darchen). Lorsque j'ai démarré mon travail de thèse, l'équipe de François Darchen travaillait sur le mécanisme d'action de Rab3 (et particulièrement Rab3a, une des 4 isoformes de cette famille) dans le contrôle de la sécrétion régulée de cellules neuroendocrines. À l'époque, les données dans ce domaine étaient déjà abondantes, mais aussi conflictuelles, si bien qu'il était difficile d'attribuer un rôle clair à Rab3.

À vrai dire, 4 ans plus tard et malgré des avancées générales dans la compréhension des mécanismes sous-tendant la sécrétion régulée des hormones et des neurotransmetteurs, il semble que la situation sur Rab3 reste encore floue. Comme pour de nombreuses autres

protéines impliquées dans ce processus biologique, une part importante de la difficulté du problème vient sans doute du fait que Rab3 n'intervient pas à une mais à plusieurs étapes du cycle que j'ai présenté. Il est donc difficile de "décortiquer" les différents effets de cette protéine, chaque étape du cycle étant fonctionnellement reliée aux autres.

Un point central du travail que nous nous proposons d'effectuer sur Rab3 était la clarification des effets du mutant Rab3aQ81L. Des effets divergents entre modèles cellulaires, mais parfois aussi au sein même d'un système, étaient rapportés. J'ai donc démarré mon travail sur cette thématique, qui devait ainsi représenter l'axe central de ma thèse. Comme on s'en doute, un sujet fixé pour 3 ou 4 ans a le temps d'évoluer, et les sujets qui "marchent" ont l'opportunité de prendre le pas sur ceux qui "marchent" moins bien.

J'ai ainsi légèrement "dévié" de ma route initiale durant quelques mois, à la suite d'un travail de mise au point d'un test de sécrétion sur population de cellules. Certains aspects des mécanismes du remplissage vésiculaire ont été révélés lors ce travail, ce qui m'a incité à approfondir certains points. Cette étude a débouché sur la publication d'un article dans *The Journal of Neurochemistry* (Schonn *et al.*, 2003).

Un an et demi environ avant l'achèvement de mon travail de thèse, une collaboration a été initiée entre notre laboratoire et le groupe de Christine Petit, à l'Institut Pasteur. Cette collaboration a abouti à la publication d'un article dans *EMBO Reports* (El-Amraoui *et al.*, 2002), où nous décrivons un nouvel effecteur des protéines Rab27, MyRIP, que nous avons un temps suspecté d'être un nouvel effecteur de Rab3. Ceci nous a naturellement amené à étudier le rôle de Rab27 et de cet effecteur dans la régulation de la sécrétion dans les modèles neuroendocriniens. Ce sont les résultats issus de cette étude que je présenterai dans la partie consacrée à Rab27 et MyRIP, et qui fait l'objet d'un manuscrit soumis à *The Journal of Cell Biology* (en révision à la date de l'écriture de ce mémoire).

Ainsi, paradoxalement, c'est le projet "Rab3", mon objectif initial, qui reste en grande partie inachevé. Je souhaite néanmoins présenter et discuter les résultats obtenus. De même, l'article publié dans *The Journal of Neurochemistry* (Schonn *et al.*, 2003) n'abordait pas certains aspects du travail, que j'ai voulu présenter dans la partie qui suit. La dernière partie,

consacrée à MyRIP et Rab27, sera présentée à la lumière de ce que nous savons néanmoins sur le rôle de Rab3.

Chapitre II

*Influence des transporteurs
plasmiques de recapture de
monoamines sur la taille du
quantum de sécrétion*

II. Influence des transporteurs plasmiques de recapture de monoamines sur la taille du quantum de sécrétion

La transmission de l'information sous forme chimique, tant par les neurones que les cellules endocrines, est sujette à de nombreux phénomènes de régulation, aussi bien au niveau des cellules émettrices que des mécanismes de réception et de transduction du signal dans les cellules cibles. Depuis les années 1950, période vers laquelle furent jetées les bases des concepts de stockage et de libération vésiculaire des NT à la suite des travaux de Fatt et Katz, le paramètre de taille du quantum de sécrétion, i.e. la quantité d'hormone ou de neuromédiateur libérée par chaque événement d'exocytose, a souvent été considéré comme relativement invariant, et de nombreuses données sur les modulations de la transmission synaptique étaient interprétées comme des variations de la réponse postsynaptique, du nombre ou de la fréquence des quanta libérés. Il est cependant désormais bien établi qu'un certain nombre de mécanismes distincts peuvent affecter cette taille quantique. Dans cette partie, organisée autour du travail publié dans *The Journal of Neurochemistry*, nous nous attacherons à décrire le rôle des transporteurs plasmiques de neuromédiateurs dans le contrôle de la taille quantique. Nous y présentons également un test, basé sur la surexpression de SERT (le transporteur plasmique de la sérotonine) destiné à la mesure de l'activité sécrétrice de cellules PC12 co-transfectées.

Chronologiquement, ce travail a en fait débuté par la mise au point de ce test, et certaines difficultés et points obscurs rencontrés alors nous ont amenés à des considérations plus fondamentales sur les mécanismes du remplissage vésiculaire. Nous adopterons ici, pour la clarté du propos, la chronologie inverse, partant d'aspects fondamentaux pour ensuite aborder l'aspect pratique du test de sécrétion sur population de cellules.

De plus, l'article publié dans *The Journal of Neurochemistry*, présenté en fin de chapitre, ne contenait pas certaines informations relatives à ce travail que je souhaiterais présenter ici. Il m'est apparu difficile de découpler ces données non publiées de celles présentées dans l'article. J'ai donc choisi d'extraire les données publiées, et de les présenter augmentées des données non présentées.

Si ce travail n'a pas directement porté sur les transporteurs vésiculaires des monoamines, il m'a semblé néanmoins souhaitable de remettre nos données en perspectives avec certains aspects liés à la thermodynamique du remplissage des GS/VS en NT, et donc de présenter leur mécanisme d'action dans les paragraphes qui suivent.

II.A. Introduction

II.A.1. Les flux ioniques et de neurotransmetteurs

Les NT classiques, i.e. non peptidiques, (aminoacides ou leurs dérivés) sont synthétisés dans le cytosol ou bien s'y retrouvent après leur pompage depuis la fente synaptique par des transporteurs plasmiques de recapture. Ainsi, leur accumulation dans les organelles sécrétoires nécessite le passage de la membrane vésiculaire. Il s'agit d'un transport actif, capable de générer des gradients de concentration très élevés. Si les transporteurs plasmiques de neurotransmetteurs utilisent un co-transport d'ions Na⁺, les transporteurs vésiculaires fonctionnent en antiports de protons, tirant ainsi parti de l'accumulation luminale d'ions H⁺ par l'ATPase/pompe à protons vésiculaire (V-ATPase).

Ce furent les études menées dans les années 1980 sur l'accumulation de monoamines par le granule chromaffine puis sur les vésicules cholinergiques de l'organe électrique du poisson *Torpedo californica* qui montrèrent empiriquement la relation entre ce pompage et le gradient de proton (ΔpH). Dans le cas du transport des monoamines, une molécule de neuromédiateur (mono-cationique) est importée en échange de l'extrusion de 2 ions H⁺, engendrant un transport électrogénique avec le transport net d'une charge positive depuis le lumen vers le cytosol à chaque cycle de transport. De façon comparable, le transport d'acétylcholine (ACh) repose essentiellement sur la "composante pH" (i.e. ΔpH) du gradient électrochimique de proton.

On peut en effet distinguer 2 composantes dans ce gradient électrochimique, dont la force respective dépend de la présence d'ions perméants, comme les ions Cl⁻ par exemple ; des considérations de thermodynamique nous enseignent que :

$$\Delta\mu_{\text{H}^+} = (F \cdot \Delta\Psi) / F - (2,3 \cdot \text{RT} \cdot \Delta\text{pH}) / F,$$

Où $\Delta\mu_{\text{H}^+}$: différence de potentiel électrochimique des protons ; $\Delta\Psi$: gradient électrique (composante "électrique") ; ΔpH : gradient de pH (composante "chimique") ; F : constante de Faraday ; R : constante des gaz parfaits ; T : température absolue.

Ainsi, l'internalisation d'anions (Cl^- par exemple) induit, par compensation des charges, un pompage de protons, donc une augmentation de la composante ΔpH . À l'inverse, si le pompage d'ions H^+ n'est pas contrebalancé (ou seulement partiellement) par un transport d'anions, la composante $\Delta\Psi$ croît.

Contrairement aux transports des monoamines et de l'ACh, certains transports, comme celui du GABA ou, dans une plus grande mesure encore, du glutamate, reposent pour l'essentiel sur la composante électrique ($\Delta\Psi$) du gradient, suggérant d'importantes différences de structures et de mécanisme entre les différents transporteurs impliqués.

Dans le cas du transport de monoamines dans le granule chromaffine qui nous intéresse plus particulièrement, le gradient développé entre l'intérieur et l'extérieur du granule est considérable. D'un point de vue théorique, l'équilibre entre les gradients électrochimiques des monoamines et des protons est décrit suivant :

$$\log\left(\frac{[\text{RNH}_3^+]_{\text{in}}}{[\text{RNH}_3^+]_{\text{ex}}}\right) = n\Delta\text{pH} + (n-1)\frac{\Delta\Psi}{Z}$$

où $Z=2,3\text{RT}/\text{F}$ et n représente le nombre d'ions H^+ requis pour le transport d'une molécule de monoamine.

Expérimentalement, il a été déterminé que $n=2$. En effet, en l'absence d'ions perméants ($\Delta\Psi$ variable), la relation entre le log du gradient de monoamines et $\Delta\Psi/Z$ est linéaire, avec une pente de 1. En revanche, en présence d'ions perméants, comme des Cl^- (ΔpH variable), le log du gradient de monoamines varie linéairement avec ΔpH selon une pente de 2.

En réécrivant l'équation précédente avec $n=2$ (pour les monoamines chargées), on obtient la relation entre les concentrations théoriques de neurotransmetteur et d'ions H^+ à l'équilibre :

$$\frac{[\text{RNH}_3^+]_{\text{in}}}{[\text{RNH}_3^+]_{\text{ex}}} = \left(\frac{[\text{H}^+]_{\text{in}}}{[\text{H}^+]_{\text{ex}}}\right)^2 \times 10^{\left(\frac{\text{F}\Delta\Psi}{2,3\text{RT}}\right)}$$

où $[RNH_3^+]$: concentration en monoamines ; $pH_{ex} \sim 7,2$; $pH_{in} \sim 5,6$; $\Delta\Psi = + 80 \text{ mV}$; $2.3RT/F \sim 60 \text{ mV}$ à 25°C .

Théoriquement, on peut donc atteindre à l'équilibre un rapport de $\sim 36.000/1$, soit 4.10^4 ! De fait, cet équilibre semble atteint dans le cas de l'accumulation des monoamines dans les granules chromaffines, où celles-ci atteignent des concentrations importantes ($\sim 550 \text{ mM}$, pour des valeurs cytosoliques inférieures à $10 \text{ }\mu\text{M}$) ; en revanche, le gradient d'ACh mesuré dans les vésicules cholinergiques de l'organe électrique de torpille ne semble pas excéder 10^2 (la concentration cytosolique en ACh étant, il est vrai, de $\sim 10 \text{ mM}$). Une des hypothèses avancées pour expliquer cette différence serait l'existence d'une fuite, soit du neuromédiateur, soit des protons – ce qui entraîne alors une chute de $\Delta\mu_H^+$. Une discussion détaillée sur l'existence et les conséquences de cette fuite sera menée dans la suite de ce chapitre.

II.A.2. Compensation osmotique ; flux ioniques compensateurs

Les molécules de neuromédiateurs classiques sont souvent chargées au pH physiologique. Leur transport du cytosol vers les organites sécrétoires peut ainsi être électrogénique. Il faut alors envisager un ou plusieurs flux ioniques compensateurs pour équilibrer la balance des charges. D'autre part, l'accumulation à forte concentration de neurotransmetteurs peut compromettre la stabilité osmotique de l'organelle. Deux options sont possibles :

- l'inactivation osmotique du neuromédiateur, comme c'est le cas dans les granules chromaffines (Kopell *et al.*, 1982; Videen *et al.*, 1992) (notamment par interaction avec les chromogranines, voir plus bas)
- l'expulsion vers le cytosol de molécules possédant une activité osmotique ; par exemple, l'extrusion d'ions Cl^- , fréquemment accumulés dans les organelles acides, semble être requise pour maintenir un équilibre osmotique.

II.A.4. Transport vésiculaire de monoamines - les VMAT

Les transporteurs responsables de l'accumulation des monoamines dans les vésicules et granules de sécrétion sont les VMAT (Vesicular MonoAmine Transporters). Ceux-ci transportent toutes les monoamines, englobant les catécholamines (dopamine, adrénaline, noradrénaline), les indolamines (comme la sérotonine), l'histamine, et aussi certains neurotransmetteurs spécifiques des invertébrés, comme la tyramine ou l'octopamine. De plus, certaines molécules artificielles sont transportées par les VMAT, comme les amphétamines (par exemple l'ecstasy), le MIBG (meta-iodo-benzylguanidine, une molécule utilisée pour l'imagerie médicale des tissus adrénergiques), ou encore le MPP⁺, une neurotoxine dérivée d'une impureté présente dans la meperidine (ou MPPP, un opiacé de synthèse), et qui a justement permis le clonage de VMAT. En bref, des cas atypiques de maladie de Parkinson avaient été diagnostiqués aux Etats-Unis dans les années 1980 chez des patients jeunes dont le point commun s'est avéré être la consommation d'une drogue synthétique, la meperidine (ou "héroïne synthétique"), contenant une impureté, le MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine), qui peut passer la barrière hémato-encéphalique et être convertie en MPP⁺ par l'action de la monoamine oxydase B dans le cerveau. Le MPP⁺, un poison de la chaîne respiratoire mitochondriale, s'accumule et touche préférentiellement les neurones monoaminergiques dans lesquels il s'accumule via l'activité des transporteurs de recapture plasmique des monoamines. De manière surprenante, la lignée PC12 (dérivant d'une tumeur de la médullo-surrénale de rat, sécrétant des monoamines) est nettement moins sensible que d'autres lignées cellulaires à l'action toxique du MPP⁺ bien qu'elle accumule cette toxine via ses transporteurs plasmiques de monoamines (principalement le transporteur de la noradrénaline NET). Le groupe de R. Edwards, en cherchant à comprendre le mécanisme de cette résistance, a finalement abouti à la découverte de VMAT, qui, du fait de la séquestration efficace du MPP⁺ qu'il entraîne dans les granules sécrétoires (Darchen *et al.*, 1988) induit la protection de la chaîne respiratoire mitochondriale (Liu *et al.*, 1992). Dans le même temps et de façon indépendante, le groupe de J. Erickson a également identifié VMAT par une stratégie de clonage par expression (Erickson *et al.*, 1992).

En fait, les transporteurs identifiés par ces deux équipes sont différents. Des analyses d'expression montrèrent que le transporteur identifié par le groupe de R. Edwards (baptisé VMAT1) était présent dans la glande surrénale, mais absent du cerveau. En revanche, le clone

identifié par J. Erickson et ses collaborateurs était présent dans le cerveau (VMAT2). Chez l'homme et le bœuf, il existe également 2 isoformes de VMAT, encodées par des gènes distincts. Quelles sont les différences entre ces 2 isoformes ? Existe-t-il une isoforme neuronale et une autre endocrine, comme pouvaient le laisser supposer les études immunocytochimiques réalisées chez le rat au moment du clonage ? Ceci doit être nuancé, mais il est vrai que VMAT2 est la seule isoforme présente dans les neurones monoaminergiques du système nerveux central ; en revanche, les isoformes VMAT1 et/ou 2 peuvent être exprimées par les cellules endocrines. Quelle est alors la raison de cette apparente spécialisation d'expression dans certains tissus ? VMAT2 possède une affinité supérieure pour les monoamines (~3 fois) à celle de VMAT1. Pour l'histamine, cette affinité est encore plus poussée (~10 fois), ce qui explique son expression exclusive dans les lignées histaminergiques, comme les mastocytes par exemple. Ainsi, l'expression de VMAT2 dans les neurones du SNC pourrait répondre, par ses meilleures capacités cinétiques, au besoin de remplissage efficace imposé par le recyclage rapide des vésicules.

II.A.5. Facteurs influençant la taille du quantum de sécrétion

La modification de la taille du quantum de sécrétion peut être un moyen simple de modifier l'efficacité de la transmission de l'information au niveau pré-synaptique. Le niveau de remplissage en monoamines (ou d'autres neuromédiateurs) est intimement lié au transport primaire de protons par la V-ATPase et au transport secondaire de neuromédiateur en échange d'ions H^+ par les VMAT ; ainsi, les événements qui peuvent influencer la concentration cytosolique en neuromédiateur jouent évidemment un rôle important dans le contrôle du niveau de remplissage. Comme nous l'avons déjà suggéré auparavant, les approches électrophysiologiques consistant en la mesure des potentiels post-synaptiques ont pu amener à minimiser l'impact éventuel des processus de régulation de la taille du quantum de sécrétion. La vision "immuable" de la taille quantique a également été entretenue par l'idée (fausse) que les récepteurs post-synaptiques des neuromédiateurs sont rapidement saturés par de faibles quantités de ceux-ci. Il est désormais clair que, pour de nombreuses synapses, les récepteurs ne sont pas toujours en conditions saturantes de neuromédiateur, et que bien souvent, ceux-ci "débordent" la stricte zone synaptique où ils sont libérés pour exercer des effets à plus grande distance, sur des synapses adjacentes. La technique de mesure ampérométrique, permettant l'accès direct aux phénomènes sécrétoires (i.e. sans reposer sur la transduction du signal dans

une cellule cible) a permis des avancées conceptuelles importantes dans la compréhension des mécanismes pré-synaptiques. Nous allons en détailler quelques aspects pouvant modifier, de façon physiologique ou artificielle, le niveau de remplissage granulaire en monoamines.

II.A.5.a. Modification de l'activité des transporteurs vésiculaires

De nombreuses études pharmacologiques ont démontré que des modifications du transport vésiculaire des NT pouvaient avoir d'importantes conséquences sur le comportement. Il était par exemple connu depuis les années 1960 que l'administration de réserpine, un puissant inhibiteur des VMAT, induit de fortes perturbations psychomotrices ; la régulation du nombre de molécules de NT par vésicule sécrétoire est ainsi un aspect crucial de la régulation de la neurotransmission. Comme nous l'avons évoqué, la capacité d'accumulation des NT (et ainsi leurs concentrations à l'équilibre) dans les granules sécrétoires par les transporteurs vésiculaires *ad hoc* ne devrait dépendre que de l'existence et de la "force" du gradient $\Delta\mu_H^+$, i.e. de considérations purement thermodynamiques.

De façon surprenante, il a été démontré que ce postulat était, sinon inexact, du moins à nuancer. Par exemple, la surexpression de VAcHT, le transporteur vésiculaire de l'ACh, par injection de l'ADNc correspondant dans l'embryon de Xénope, augmente la taille quantique d'ACh à la JNM (Song *et al.*, 1997) suggérant qu'en temps normal les vésicules n'ont pas atteint l'équilibre de leur niveau de remplissage en ACh. De façon comparable, l'inactivation du gène codant VMAT2 (Fon *et al.*, 1997; Takahashi *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997b; Travis *et al.*, 2000) chez la souris, ou au contraire sa surexpression dans les cellules PC12 (Pothos *et al.*, 2000) induisent des modifications de la taille quantique, i.e. une diminution et une augmentation, respectivement. Ainsi, des souris hétérozygotes VMAT2 +/- (dont le niveau d'expression de la protéine est de moitié inférieur à celui de souris VMAT2 +/+) présentent une sécrétion altérée de monoamines (Fon *et al.*, 1997; Travis *et al.*, 2000) (étude menée sur des neurones monoaminergiques et des mastocytes, respectivement). Lors d'une stimulation de l'exocytose, les cultures de neurones issues d'animaux hétérozygotes ont une sécrétion diminuée de 50% par rapport au contrôle (cultures issues d'animaux WT), à mettre en parallèle avec les niveaux d'accumulation de DA et 5-HT par ces cultures, eux aussi diminués d'un facteur 2 (Fon *et al.*, 1997).

Pour rendre compte de cette diminution de capacité de stockage et de libération des monoamines par les animaux hétérozygotes VMAT2 $-/+$, les auteurs proposent que l'inactivation de VMAT2 influence le taux de remplissage, l'hypothèse sous-jacente étant le contrôle cinétique du remplissage vésiculaire par les transporteurs ; les conclusions des autres groupes (Takahashi *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997b; Travis *et al.*, 2000) sont similaires. De même, et en accord avec les effets observés lors de l'administration de réserpine sur le comportement (voir plus haut), l'application de ce bloqueur des VMAT diminue rapidement et fortement la taille quantique, mesurée par ampérométrie sur des cellules PC12 (Kozminski *et al.*, 1998; Colliver *et al.*, 2000).

L'étude en quelque sorte "symétrique" menée par Pothos et coll. consistant en la surexpression de VMAT2 dans différents types cellulaires va également dans ce sens. Ainsi, la surexpression de VMAT2 et de la tyrosine hydroxylase (TH), la première enzyme de la voie de synthèse des catécholamines à partir de la tyrosine, induit une sécrétion de dopamine (DA) dans la lignée cellulaire AtT-20 (Pothos *et al.*, 2000). La surexpression de VMAT2 dans une population de cellules PC12 accroît fortement (~400 %) la taille des quanta libérés, sans en affecter la fréquence. Les auteurs de l'étude proposent ainsi l'hypothèse de l'existence d'une "fuite" vésiculaire, qui avait été précédemment montrée dans des préparations *in vitro* de vésicules synaptiques isolées (Floor *et al.*, 1995) pour expliquer l'apparent contrôle cinétique, et non thermodynamique, du remplissage vésiculaire (cet aspect sera rediscuté).

II.A.5.b. Altération du gradient de proton

II.A.5.b.i. Action sur la V-ATPase

La modification du gradient de proton affecte indirectement l'importation de monoamines par le système d'échange monoamines/protons. Plusieurs possibilités expérimentales existent pour collapser le gradient de protons. Par exemple, l'inhibition de l'activité des V-ATPases par la bafilomycine A1 diminue fortement la taille des événements mesurés par ampérométrie dans des cellules chromaffines (Sulzer *et al.*, 2000) et les événements miniatures dans des coupes d'hippocampe de rat (Zhou *et al.*, 2000). L'effet pharmacologique de la bafilomycine pourrait mimer, en l'exagérant, les effets de régulations physiologiques de l'activité de transport des protons par les V-ATPases sur la taille quantique. En revanche, l'utilisation d'autres drogues visant à collapser le gradient de protons, comme

les protonophores, semble plus sujette à caution. En effet, ces drogues sont peu spécifiques et tendent à affecter tous les gradients de protons existants dans la cellule, en particulier le gradient mitochondrial, dont l'altération est rapidement suivie d'effets délétères pour la cellule.

II.A.5.b.ii. Action de bases faibles

Les bases faibles, en neutralisant les protons luminaux, permettent aussi de modifier le pH granulaire. C'est le principe d'action des amphétamines, qui induisent la libération de neurotransmetteurs par un mécanisme non exocytotique. Les amphétamines (D-amphétamine, méthamphétamine, fenfluramine, MDMA aussi connue sous le nom d'ecstasy) peuvent pénétrer, soit sous leur forme neutre par diffusion dans la membrane vésiculaire, soit par transport actif par les VMAT, à l'intérieur des granules où elles rentrent alors en compétition avec les molécules de DA pour les protons. Quand les capacités tampon du lumen granulaire sont dépassées, les molécules neutres de DA diffusent alors vers le cytosol, où leur concentration croissante entraîne le fonctionnement inverse du transporteur plasmique de la DA, DAT. Il en résulte une diffusion lente, non exocytotique, de DA dans la fente synaptique, responsable des effets de ces drogues. De fait, en induisant cette fuite, les amphétamines diminuent la taille quantique, comme cela est vu *in vitro* sur des cellules PC12 en culture après application d'amphétamine (Sulzer *et al.*, 1995), ou encore *in vivo* sur des tranches de cerveau (Jones *et al.*, 1998).

II.A.5.c. Modification de la concentration cytosolique en neurotransmetteur

Les considérations thermodynamiques évoquées plus haut indiquent clairement que toute modification de la concentration cytosolique en neurotransmetteur doit mécaniquement avoir une répercussion sur sa concentration vésiculaire. Plusieurs mécanismes physiologiques peuvent, *a priori*, avoir une incidence sur le niveau cytosolique des neurotransmetteurs, comme l'activité d'enzymes impliquées dans leur biosynthèse ou, au contraire, leur dégradation, les activités des transporteurs plasmiques, etc.

II.A.5.c.i. Accroissement direct ou indirect du pool cytosolique de monoamines

Expérimentalement, il est par exemple possible d'accroître la taille quantique dans des cellules PC12 après exposition à de fortes concentrations de DA extracellulaire (Pothos *et al.*,

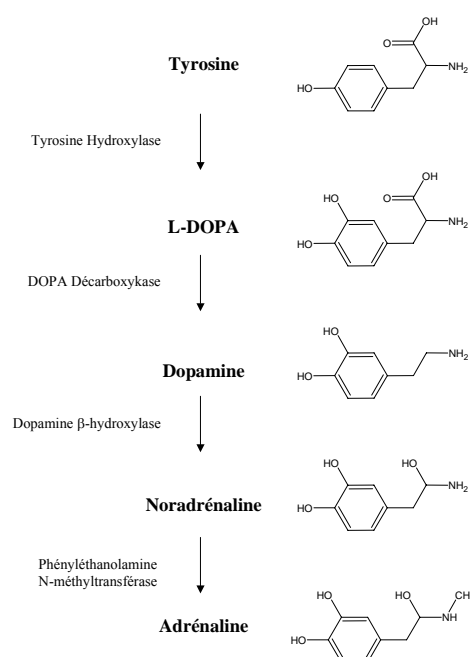
1998b). Dans les neurones dopaminergiques, il est également possible d'influencer le niveau cytosolique de DA en modifiant le niveau d'un intermédiaire de synthèse, la L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphénylalanine), dont la synthèse depuis la tyrosine par la tyrosine hydroxylase (TH) constitue l'étape de vitesse limitante dans la voie de synthèse des catécholamines. De fait, le niveau d'expression de la TH est finement contrôlé, en particulier par la voie de signalisation en aval de l'activation des récepteurs D2 de la DA.

L'application de L-DOPA, qui est utilisée comme traitement de la maladie de Parkinson, sur des neurones dopaminergiques ou des cellules PC12 induit une augmentation rapide de la taille des quanta (Pothos *et al.*, 1996; Pothos *et al.*, 1998a). Cette augmentation est probablement due à l'élévation du niveau cytosolique de DA, résultant de la conversion de la L-DOPA en DA par l'action de la DOPA décarboxylase (voir la voie de biosynthèse des catécholamines, Figure 15)

Figure 15

Voie de synthèse des catécholamines à partir de la tyrosine. La conversion de la tyrosine en L-DOPA par l'action de la tyrosine hydroxylase (TH) est une étape clé dans le contrôle de cette voie biosynthétique. Cette étape (et celles qui la suivent) est finement contrôlée par des régulations du niveau d'expression de la TH (niveaux transcriptionnels et traductionnels) ainsi que par la régulation directe de son activité enzymatique.

On notera que la dopamine β -hydroxylase (DBH), à l'inverse des autres enzymes de cette voie, est localisée dans les granules sécrétoires. La noradrénaline, ainsi produite au sein même de l'organelle, doit en être extrudée pour sa conversion en adrénaline par action de la PNMT cytosolique (dans les cellules adrénérgiques). Cette sortie peut s'opérer par le biais d'un transport inverse par les VMAT, ou par l'existence d'une fuite vésiculaire des monoamines (voir la suite de ce chapitre).



II.A.5.c.ii. Diminution du pool cytosolique

À l'opposé, certains processus sont susceptibles de diminuer la taille quantique en neurotransmetteurs en abaissant leur concentration cytosolique. Les monoamines oxydases

notamment, en abaissant la disponibilité en monoamines, jouent un rôle important dans la régulation du pool cytosolique ; ce point sera plus amplement débattu par la suite (présentation des résultats de l'article publié dans *The Journal of Neurochemistry*).

II.A.5.c.iii. Modification du transport plasmique de monoamines

La dernière possibilité de modifier la concentration cytosolique en NT, et donc *in fine* leur concentration vésiculaire, est d'interférer sur leur capture ou recapture par les transporteurs plasmiques. C'est par ce mode d'action qu'agissent certains agents pharmacologiques stupéfiants, comme la cocaïne ou la nomifensine, qui bloquent la recapture de la DA par DAT (mais aussi NET et SERT). Si l'effet de la surexpression ou la diminution d'expression des transporteurs vésiculaires sur la taille quantique est assez bien documenté, l'influence des régulations des transporteurs plasmiques de NT sur cette taille quantique est moins bien décrite. C'est cet aspect que nous avons étudié dans le travail publié dans *The Journal of Neurochemistry*, et qui est présenté dans les chapitres suivants.

II.B. Influence de l'expression de transporteurs plasmiques de recapture des monoamines sur la taille du quantum de sécrétion

II.B.1. Contexte de l'étude - Bref historique

Au cours de ma seconde année de thèse, des observations concernant la faible activité de transport de la sérotonine (5-HT) dans les cellules PC12 m'ont amené à m'intéresser aux effets de la surexpression transitoire de SERT (SERotonin plasma membrane Transporter, le transporteur plasmique de recapture de la 5-HT) dans ces cellules ; initialement, les mesures de l'effet d'une protéine d'intérêt sur la sécrétion se faisaient au laboratoire par 2 techniques complémentaires, l'ampérométrie à fibre de carbone et les tests au niveau de populations entières avec la technique décrite par le groupe de Holz (Wick *et al.*, 1993) ; cette méthode est basée sur la co-transfection de vecteurs codant, d'une part, la protéine d'étude, et d'autre part l'hormone de croissance humaine (hGH, human growth hormone). Plusieurs études, ainsi que nos propres observations, montrent en effet que lors de l'utilisation de 2 vecteurs durant le processus de transfection, la grande majorité (>95%) des cellules transfectées reçoivent les 2

constructions. Cette approche permet une mesure sélective de l'activité sécrétrice de la sous-population de cellules transfectées, qui représente usuellement 10-20% de la population totale.

Le rapporteur utilisé ici (hGH) n'est pas présent dans les cellules naïves, et cette hormone est correctement exprimée dans ces cellules qui la stockent dans leurs GS. Il est ainsi relativement aisé de récupérer le surnageant des cellules après stimulation de la sécrétion (par une solution à $[K^+]$ élevée, par exemple), de préparer un lysat des cellules et de doser indépendamment la hGH présente dans chaque échantillon (surnageant et cellules); la technique utilisée au laboratoire (ELISA) pour ce dosage est basée sur une immuno-adsorption de la hGH par des anticorps dirigés contre elle suivie d'une réaction enzymatique produisant un produit coloré. L'intensité de coloration, proportionnelle dans une certaine limite à la quantité de hGH, est mesurable par spectrophotométrie.

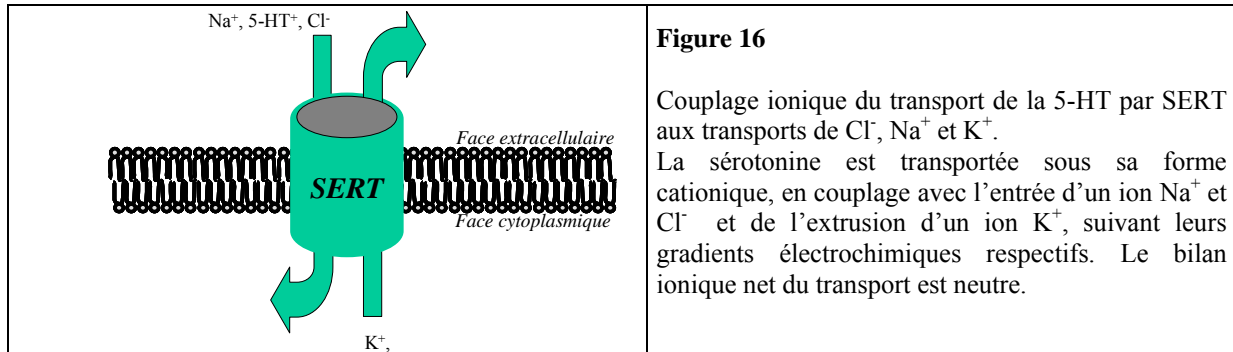
Ce test a été largement utilisé pour l'étude des mécanismes de la sécrétion régulée dans les cellules PC12 et chromaffines. Cependant, certaines difficultés rendent l'utilisation de cette technique délicate. En premier lieu, des problèmes de reproductibilité de la quantité totale d'hormone synthétisée sont couramment rencontrés, malgré des efforts de standardisation des conditions de culture et de transfection; cette hétérogénéité pourrait sembler anecdotique puisque, dans des conditions contrôles (co-transfection de la hGH avec un vecteur vide, par exemple), la proportion de hGH libérée lors d'une stimulation classique (10 minutes de dépolarisation par 55 mM K^+) est relativement constante (~15-20% typiquement). En réalité, si la fraction libérée est certes à peu près invariante dans les contrôles, la quantité totale de hGH exprimée est beaucoup plus variable, en particulier lors de la surexpression simultanée de diverses protéines d'intérêt.

Ceci entraîne une complication technique liée à la nature de la technique de détection de la hGH, i.e. par une réaction enzymatique colorée, qui n'offre une linéarité de réponse que pour des quantités limitées d'hormone.

La saturabilité de la réponse du test colorimétrique, ainsi que la forte hétérogénéité des niveaux totaux de hGH lors de la surexpression des protéines d'intérêt, conduisent fréquemment à devoir effectuer des mesures supplémentaires des échantillons hors de la zone de réponse linéaire. Outre un alourdissement considérable du protocole, la multiplication des

points de mesure pour chaque échantillon devient problématique si l'on considère le coût élevé des réactifs nécessaires au dosage de la hGH. Un autre problème, compromettant la validité du test en tant qu'outil de mesure de la sécrétion, peut être rencontré si la protéine d'intérêt interfère avec le trafic de la hGH ou bien la biogenèse des granules sécrétoires.

Dans le but de minimiser les risques de devoir effectuer plusieurs déterminations de la quantité de hGH pour de nombreux échantillons, nous avons cherché à caractériser, avant le dosage de hGH, l'activité sécrétrice des cellules (l'ensemble de la population) par un test simple, permettant par exemple d'estimer au préalable plus finement la quantité de cellules disponibles et le niveau de leur sécrétion le jour de l'expérience. Pour ce faire, une partie des cellules co-transfectées par la hGH étaient chargées en présence de sérotonine tritiée ($[^3\text{H}]5\text{-HT}$), puis leur capacité sécrétoire globale en réponse à une stimulation était estimée par détermination des quantités libérées et restantes de $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ dans les cellules. Les informations obtenues (quantité totale de $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ accumulée et proportion libérée) permettaient d'anticiper les conditions de dilutions des échantillons à utiliser lors du dosage de la hGH.



II.B.2. Les cellules PC12 sont dépourvues de transport efficace de la 5-HT

Dans nos conditions de culture, et au moins avec le clone de PC12 en notre possession, les niveaux de charge en $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ par les cellules sont faibles ($4,0 \pm 0,3$ fmol/min/ 10^6 cellules, n=11, mesure réalisée pour des temps courts de capture (<30 min) où celle-ci croit de manière linéaire). Bruno Gasnier, appartenant à une autre équipe du laboratoire et spécialiste des transporteurs vésiculaires de neurotransmetteurs, nous suggéra

d'augmenter cette capacité d'accumulation en exprimant SERT, le transporteur plasmique de recapture de la 5-HT, dans ces cellules.

De fait, les expériences préliminaires montrèrent une importante augmentation de la capture de [³H]5-HT après transfection transitoire de SERT dans ces cellules. Il nous apparut rapidement qu'il était possible de tirer profit de cette observation pour déterminer spécifiquement l'activité sécrétrice de la sous-population ainsi transfectée, plutôt que d'utiliser la mesure de la sécrétion de la hGH. Une part importante de mon travail dans les mois qui suivirent fut employée à mettre au point et à valider ce test. Au cours de ce travail, j'ai été amené à m'intéresser à certains aspects liant la surexpression des transporteurs plasmiques des monoamines à la régulation de la taille quantique.

II.B.3. L'expression de SERT induit une considérable accumulation de [³H]5-HT dans les PC12

L'augmentation de l'accumulation de [³H]5-HT présentée sur la Figure 17, déjà considérable en valeur absolue, est en fait encore plus considérable si l'on considère que seule une minorité de cellules transfectées y contribue. Dans les conditions usuelles de transfection utilisées dans cette étude, ~10 à 20 % des cellules PC12 expriment la GFP utilisée comme rapporteur de l'efficacité de transfection. Ceci implique qu'une cellule exprimant effectivement SERT possède une capacité d'accumulation de la 5-HT 100 à 200 fois supérieure à une cellule non transfectée. L'effet d'augmentation de la capture de 5-HT est détectable dès 24 heures après la transfection, puis croît régulièrement jusqu'à 4-5 jours post-transfection.

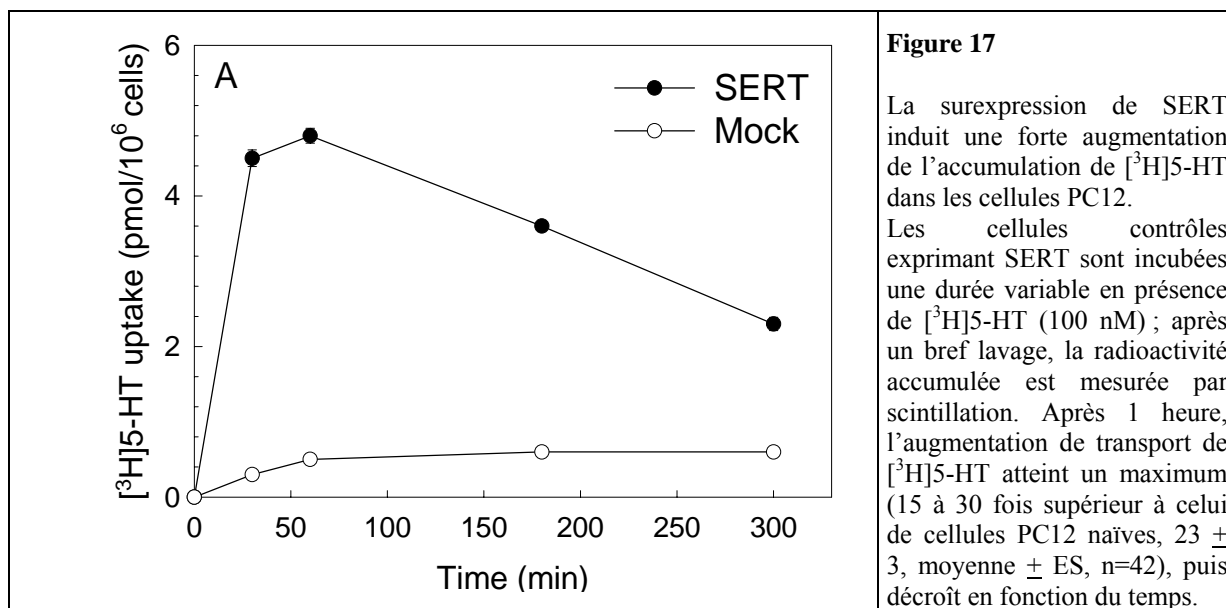


Figure 17

La surexpression de SERT induit une forte augmentation de l'accumulation de [³H]5-HT dans les cellules PC12.

Les cellules contrôles exprimant SERT sont incubées une durée variable en présence de [³H]5-HT (100 nM) ; après un bref lavage, la radioactivité accumulée est mesurée par scintillation. Après 1 heure, l'augmentation de transport de [³H]5-HT atteint un maximum (15 à 30 fois supérieur à celui de cellules PC12 naïves, 23 ± 3, moyenne ± ES, n=42), puis décroît en fonction du temps.

Cet accroissement considérable de la capture de [³H]5-HT est bien induit par l'expression de SERT, comme l'atteste son inhibition par la clomipramine lors de la phase de charge, avec une IC₅₀ en bonne adéquation avec l'affinité rapportée de cette drogue pour SERT (Hoffman *et al.*, 1991). Cet agent, assez spécifique de SERT, n'a en revanche que peu d'effet, même à dose élevée, sur la capacité de capture de [³H]5-HT par des cellules naïves, attestant l'absence de SERT dans ces cellules.

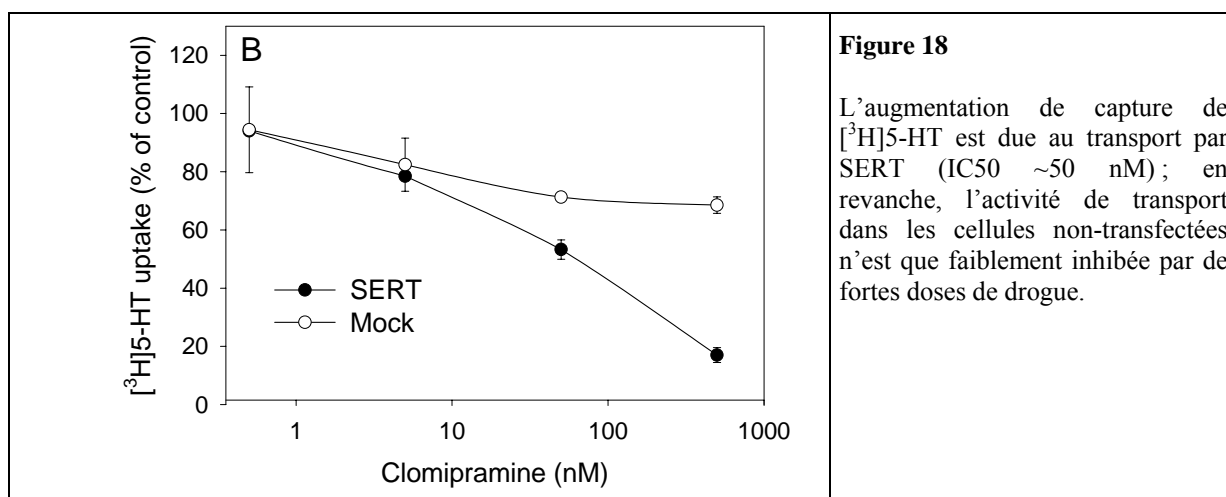


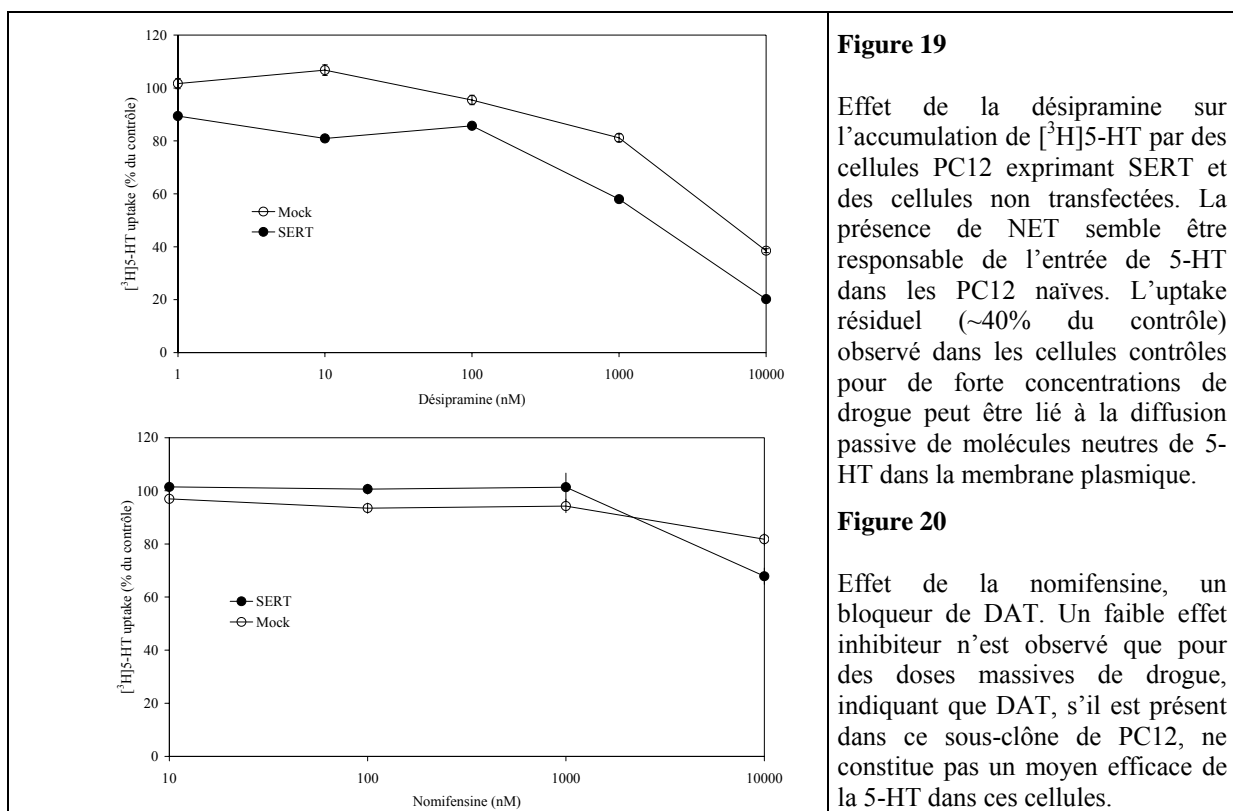
Figure 18

L'augmentation de capture de [³H]5-HT est due au transport par SERT (IC₅₀ ~50 nM) ; en revanche, l'activité de transport dans les cellules non-transfectées n'est que faiblement inhibée par de fortes doses de drogue.

Nous avons également cherché à comprendre par quels mécanismes se faisait l'entrée de 5-HT dans les cellules PC12 non transfectées. Il semblait raisonnable de penser que ces voies d'entrée pouvaient être DAT ou NET. En effet, les PC12, du moins le clone original isolé par Greene et Tischler il y a 27 ans, synthétisent, stockent et sécrètent la DA et la

noradrénaline (Greene *et al.*, 1976). Le transporteur de noradrénaline chez le rat (rNET) a d'ailleurs été cloné dans les PC12 (Bruss *et al.*, 1997), et DAT y est également présent (Kadota *et al.*, 1996; Weatherspoon *et al.*, 1999; Zachor *et al.*, 2000).

De fait, l'accumulation dans les cellules, transfectées par SERT ou non, est inhibée en présence de désipramine, un inhibiteur de NET (IC₅₀ ~10 µM) mais qui peut également inhiber l'activité de SERT à plus forte concentration. La désipramine inhibe fortement l'accumulation de [³H]5-HT dans les cellules non transfectées (un effet attribuable à l'inhibition de NET, dans la mesure où SERT ne semble pas y être présent, voir Figure 18). En revanche, l'action de la nomifensine, un inhibiteur de DAT (mais aussi connu pour inhiber NET avec une moindre efficacité) n'a que peu d'effet, même à de fortes concentrations, ce qui invalide la présence de DAT comme porte d'entrée de la 5-HT dans les cellules PC12 naïves. La voie d'entrée majoritaire de la 5-HT dans les PC12 naïves semble par conséquent être la présence de NET à leur membrane plasmique. L'uptake résiduel observé à forte concentration de désipramine peut-être imputé à une diffusion des molécules de 5-HT neutres (non protonées) dans les bicouches lipidiques.



Un point marquant des données présentées en Figure 17 est l'augmentation massive de la capture de [³H]5-HT jusqu'à une heure, suivie d'une lente décroissance ($t_{1/2} \sim 4$ heures) dans les cellules exprimant SERT.

Plusieurs hypothèses pourraient rendre compte de cette constatation :

- 1- le transport de [³H]5-HT par SERT n'est pas continu dans le temps ; après une période d'activité, le transporteur est inactivé par un mécanisme quelconque.

Si ceci est vérifié, une condition supplémentaire serait que la [³H]5-HT capturée par les cellules n'y est pas efficacement retenue ; cela pourrait être dû à l'absence de moyens de transports efficaces dans les organites appropriés (une absence de VMAT sur les granules sécrétoires, par exemple, ou un défaut d'acidification des granules par manque de la V-ATPase) ; si la [³H]5-HT est correctement accumulée dans les granules, la décroissance observée traduirait alors l'existence d'une "fuite" des granules vers le cytosol, puis vers l'extérieur de la cellule (où elle ne serait pas réinternalisée, si SERT est inactif) ;

- 2- le transport de [³H]5-HT par SERT est continu dans le temps, mais un mécanisme autre que l'accumulation dans les granules sécrétoires "consomme" la [³H]5-HT disponible au contact des cellules et la modifie chimiquement, la rendant indisponible pour le stockage dans ces organites.

Ces hypothèses ne sont évidemment pas mutuellement exclusives. L'existence d'une fuite vésiculaire est connue (voir une discussion détaillée plus loin dans ce chapitre) même si les données disponibles concernent surtout les vésicules synaptiques, de taille et de composition *a priori* très différentes des organites impliqués ici. Une hypothétique régulation de SERT inactivant le transporteur était envisageable, dans la mesure où un certain nombre de mécanismes régulateurs de l'activité des transporteurs plasmiques de recapture des monoamines (DAT, NET et SERT) sont connus.

II.B.4. Mécanismes régulateurs de l'activité de SERT

Dans le cas de SERT, plusieurs types de mécanismes de régulation sont décrits, même si le détail des processus en jeu reste assez flou ; certains passent par une régulation de la transcription ou de la traduction du gène ou des messagers des SERT, respectivement. Cependant, le temps de mise en place de tels mécanismes rend leur intervention improbable dans le cas présent. Si dans le cas présent, l'existence d'une régulation négative de l'activité de SERT était avérée, sa modulation par des mécanismes de phosphorylation ou de translocation serait plus probable.

II.B.4.a. Régulation de SERT par $[Ca^{2+}]_i$

De fait, il a été démontré que l'activité de transport de SERT pouvait être modifiée de façon rapide par différents facteurs. La concentration intracellulaire $[Ca^{2+}]_i$, par le biais de la calmoduline, semble l'affecter, ce qui est évidemment intéressant dans un système où la libération des hormones/NT est régulée par l'élévation de $[Ca^{2+}]_i$. Ainsi, la chélation des ions Ca^{2+} (extra- et intracellulaires) diminue très considérablement l'accumulation de $[^3H]5-HT$ dans les plaquettes (Nishio *et al.*, 1995), sans *a priori* affecter les flux ioniques nécessaires au fonctionnement intrinsèque du transporteur (Na^+ , K^+ , Cl^-). Dans notre expérience (capture de $[^3H]5-HT$ au repos, sans modification de l'influx/efflux de Ca^{2+}), une baisse de la $[Ca^{2+}]_i$ permettant d'expliquer la chute d'activité de SERT semble peu probable.

II.B.4.b. Régulation de SERT par les flux ioniques

Une forte concentration extracellulaire d'ions K^+ (par exemple lors d'une dépolarisation par 55 mM K^+) a aussi été rapportée comme pouvant promouvoir la libération non exocytotique de la 5-HT libre dans le cytosol par inversion du transporteur. Cela ne semble pas pouvoir être le cas ici avec les concentrations physiologiques extracellulaires utilisées pour les différents ions, en particulier ceux impliqués dans le mécanisme de transport de la 5-HT par SERT (Cl^- , Na^+ et K^+ ; voir Figure 16).

II.B.4.c. Régulation de SERT par des mécanismes de phosphorylation

Les SERT comportent plusieurs sites canoniques de phosphorylation sur sérine ou thréonine dans des domaines prédits comme cytosoliques (extrémités amino- et

carboxyterminales), et l'activation de la PKC par des esters de phorbols (comme le PMA) réduit rapidement l'activité de SERT (Anderson *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 1994; Qian *et al.*, 1995), apparemment en affectant le V_{max} , avec également un effet modéré sur le K_m (Anderson *et al.*, 1992; Qian *et al.*, 1995). Ces études suggéraient plutôt une régulation de l'activité catalytique de SERT par la PKC. Plus récemment, des effets de l'activation de la PKC par le PMA sur la localisation de SERT à la membrane plasmique ont été décrits. Il en résulte une diminution de la quantité de SERT présent à la membrane plasmique (Qian *et al.*, 1997), suggérant ici un contrôle de la localisation à la membrane, plutôt que des propriétés catalytiques du transporteur.

Bien qu'une phosphorylation de SERT ait été observée *in vitro* (Qian *et al.*, 1995) sur des sérines et thréonines des régions terminales, ces données doivent être observées avec prudence, dans la mesure où la PKA phosphoryle également ces domaines, alors que cette kinase n'a pu être impliquée pour l'heure dans aucune régulation de SERT. La régulation de SERT dépendante de la PKC pourrait tout aussi bien passer par un mécanisme indirect (activation par phosphorylation d'une protéine régulatrice de SERT, par exemple).

La possibilité que SERT soit également régulé par le biais d'une cascade aboutissant à l'activation de tyrosine-kinases a été proposée, suite aux effets observés de certains inhibiteurs spécifiques de ces kinases (genisteine, herbimycine et méthyl 2,5-dihydroxycinnamate) sur la capture de 5-HT dans les plaquettes sanguines (Helmeste *et al.*, 1995). On notera néanmoins qu'une de ces effets pourrait passer par la diminution de $[Ca^{2+}]_i$ également observée avec ces drogues, par exemple avec la genisteine (voir l'effet de la modification de $[Ca^{2+}]_i$ sur le fonctionnement de SERT évoqué plus haut dans ce chapitre). Cependant, une part de ces effets semble bien indépendante des ions Ca^{2+} , mais les mécanismes précis de cette régulation sont inconnus. Comme nous venons de l'évoquer pour le cas des phosphorylations sur Ser/Thr, l'effet de ces drogues pourrait être indirectement relayé par l'activation/inactivation d'une protéine régulatrice intermédiaire, d'autant plus qu'aucun site consensuel de phosphorylation sur tyrosine n'a été clairement établi dans SERT.

II.B.4.d. Régulation de l'activité de SERT par l'usage

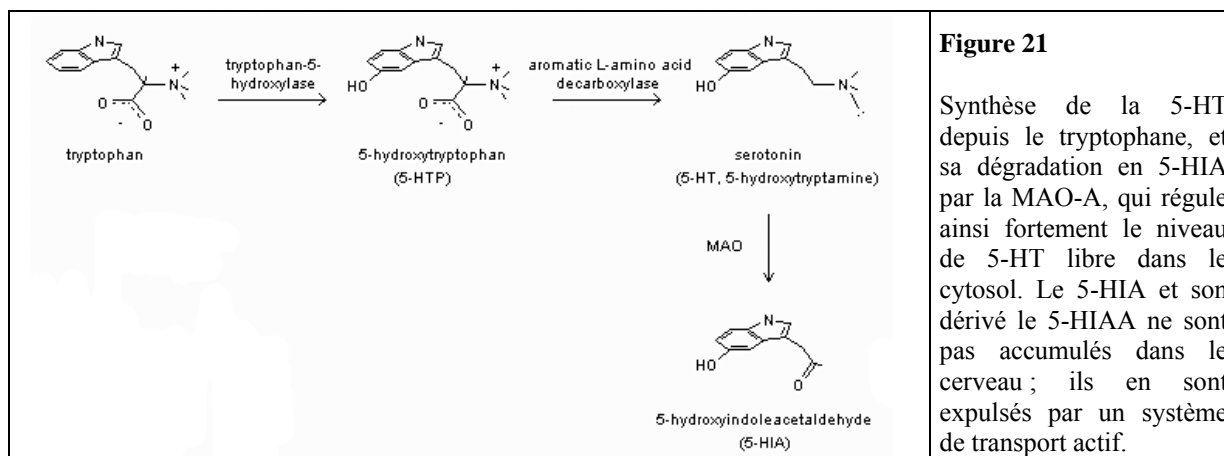
Dans notre expérience (accumulation au cours du temps de [³H]5-HT par des cellules PC12 exprimant SERT, voir Figure 17), la baisse de la capture de [³H]5-HT après une heure suggérerait une régulation liée à l'usage. Une diminution du nombre de transporteurs à la membrane plasmique pourrait en être à l'origine, puisque une telle régulation existe (voir paragraphe précédent). Cependant, les seules données disponibles sur la régulation de SERT par la liaison de son substrat naturel, la 5-HT, plaident pour un effet inverse ; le groupe de Randy Blakely a démontré que la liaison de la 5-HT (et d'autres substrats perméants) à SERT prévenait sa phosphorylation et son internalisation, et donc, son inactivation fonctionnelle (Ramamoorthy *et al.*, 1999; Bauman *et al.*, 2000) et que cette liaison augmenterait également l'interaction de SERT avec la protéine phosphatase A2 (Bauman *et al.*, 2000).

En conclusion, les données disponibles sur la régulation de SERT par l'usage (i.e. le transport de 5-HT, ou du moins la liaison de 5-HT sur le transporteur) ne peuvent expliquer l'effet observé de diminution de la [³H]5-HT accumulée après une heure.

II.B.5. Les monoamines oxydases abaissent le taux de monoamines cytosoliques

Une hypothèse alternative pouvant rendre compte de cette diminution de la quantité totale de [³H]5-HT accumulée dans les cellules exprimant SERT après une heure d'incubation serait sa dégradation suite à son internalisation dans les cellules.

Les monoamine oxydases (MAO) sont des acteurs importants du métabolisme des monoamines. Ces protéines (2 isoformes, A et B, ~70% d'identité protéique) sont présentes sur la membrane externe des mitochondries ; elles jouent un rôle important dans la régulation des niveaux de monoamines cellulaires, en particulier dans le système nerveux central. Dans le cerveau, le turnover rapide de la 5-HT ($t_{1/2}$ ~1 heure) serait majoritairement le fait de sa dégradation par les MAO (ici la MAO-A, l'isoforme majoritairement (~80%) trouvée dans le cerveau). Pour preuve, la concentration de 5-HIAA (acide 5-hydroxyindoléacétique), le produit de dégradation de la 5-HT par la MAO-A (voir Figure 21), est dans cet organe environ 1000 fois supérieure à celle de la 5-HT elle-même.



Les cellules PC12 expriment l'isoforme A, et apparemment pas ou extrêmement peu l'isoforme B (Youdim *et al.*, 1986), du moins pas dans des conditions standard de culture, ce qui les rapproche d'ailleurs plus de neurones sympathiques (exprimant MAO-A) que des cellules chromaffines (exprimant MAO-B). Le meilleur substrat de la MAO-A étant la 5-HT ($K_m \sim 170 \mu M$), et du fait du rôle important de cette enzyme dans la dégradation de la 5-HT neuronale, nous avons étudié le rôle que pourrait avoir l'inhibition de cette enzyme sur la capacité d'accumulation et de sécrétion des cellules PC12 exprimant SERT.

Les résultats présentés sur la Figure 22 mettent en parallèle l'évolution de la quantité totale de [3H]5-HT accumulée par des cellules exprimant ou non SERT, en présence ou absence de pargyline, un inhibiteur des MAO. Du fait du fort accroissement de la capture/rétention de [3H]5-HT en présence de pargyline dans les cellules exprimant SERT, on peut déduire que la dégradation de [3H]5-HT par la MAO-A est un processus quantitativement important dans les conditions contrôles. Comme VMAT convertit le $\Delta\mu H^+$ en un gradient de 5-HT (voir plus haut), en réduisant rapidement la concentration cytosolique de [3H]5-HT libre, la MAO-A limite le niveau de remplissage des granules. Un autre point marquant est l'absence de diminution de la quantité totale de [3H]5-HT accumulée au cours du temps en présence de pargyline. Ceci semble invalider la possibilité d'une régulation de l'activité de SERT après une certaine durée d'activité, comme suggéré précédemment. Alternativement, il faudrait envisager une action de la pargyline, directe ou indirecte, qui tendrait à éliminer cette régulation de SERT, ce qui n'est pas décrit dans la littérature.

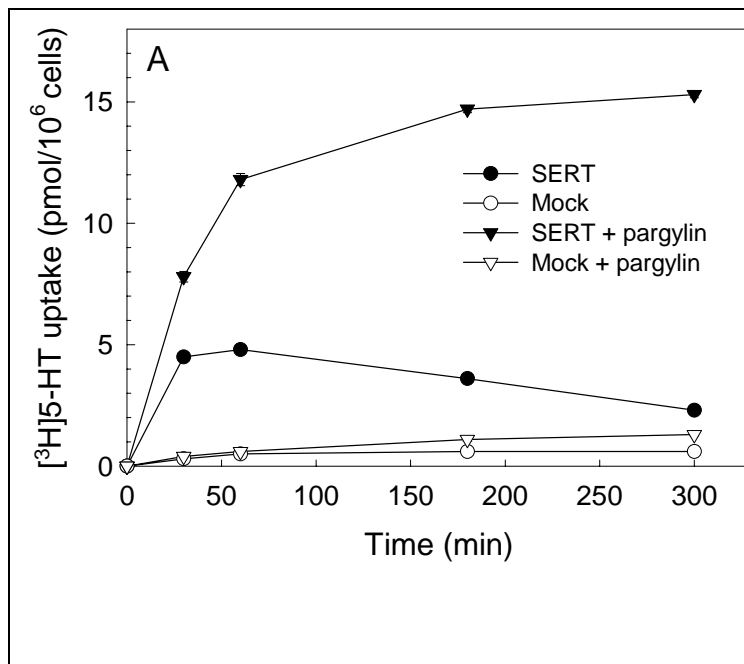


Figure 22

Effet de l'inhibition de la MAO-A par la pargyline sur l'accumulation de [³H]5-HT au cours du temps. La capture de [³H]5-HT est réalisée en présence ou absence de pargyline (100 μM) durant des temps variables. Après de brefs rinçages, la radioactivité totale accumulée dans les cellules est déterminée. On notera le fort accroissement de l'accumulation de [³H]5-HT en réponse à l'inhibition de la MAO-A (seule isoforme présente) par la pargyline. Cet accroissement n'est pas stoppé après une heure de capture, suggérant que l'hypothèse d'une inactivation de SERT rendant compte de la diminution de la [³H]5-HT accumulée dans les cellules SERT contrôles après 1 heure n'est pas valide.

Comment expliquer alors cette baisse de la quantité totale de [³H]5-HT contenue dans les cellules après 1 heure si SERT n'est pas inactivé ? Une explication serait la consommation rapide, en condition contrôle (i.e. sans pargyline), de la quasi-totalité de la [³H]5-HT mise au contact des cellules lors du test. En effet, la bonne efficacité de SERT à transporter la [³H]5-HT dans les cellules transfectées, et la forte capacité de la MAO-A à dégrader cette dernière pourrait rapidement aboutir à une raréfaction des molécules de [³H]5-HT intactes au contact des cellules, i.e. transportables par VMAT, et donc par la suite relativement protégées de la MAO-A dans les granules.

II.B.6. L'accumulation cellulaire de [³H]5-HT induite par l'expression de SERT reflète un accroissement du contenu granulaire, et non cytosolique

Ces données suggèrent ainsi une dégradation efficace de la [³H]5-HT cytosolique par la MAO-A. Cette dégradation est-elle si efficace que les molécules de 5-HT, sitôt internalisées grâce à SERT, sont dégradées sans atteindre les granules ? Autrement dit, l'augmentation de capture observée avec SERT traduit-elle autre chose que l'accumulation transitoire de [³H]5-HT dans le cytosol avant sa dégradation par la MAO-A ? Nous avons mesuré la taille du pool cytosolique libre de [³H]5-HT, ou du moins le pool non internalisé

par l'activité des VMAT, en réalisant l'incubation en présence de réserpine, un inhibiteur puissant des VMAT (voir Figure 23).

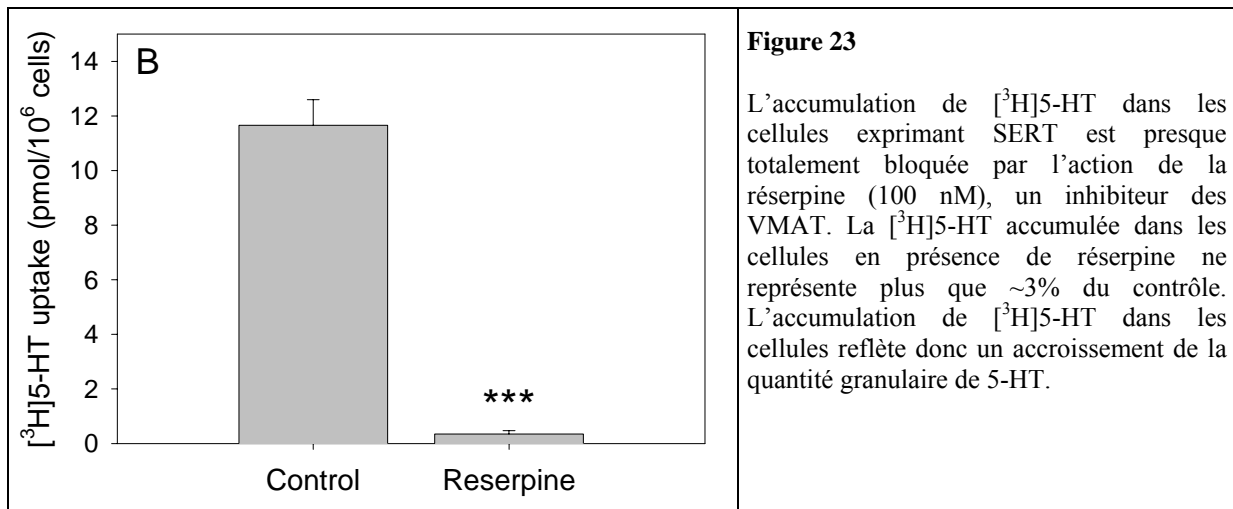


Figure 23

L'accumulation de [³H]5-HT dans les cellules exprimant SERT est presque totalement bloquée par l'action de la réserpine (100 nM), un inhibiteur des VMAT. La [³H]5-HT accumulée dans les cellules en présence de réserpine ne représente plus que ~3% du contrôle. L'accumulation de [³H]5-HT dans les cellules reflète donc un accroissement de la quantité granulaire de 5-HT.

Dans ces conditions, seule une part résiduelle (~3%) de l'accumulation de [³H]5-HT observée dans les cellules SERT contrôles (non traitées) subsiste, montrant qu'il n'existe virtuellement pas de pool cytosolique de [³H]5-HT libre. Un argument supplémentaire est le fait que la perméabilisation des cellules exprimant SERT, à l'aide de toxines bactériennes (SLO, α -toxine) ou de détergents (digitonine) après la période de capture de la [³H]5-HT n'induit pas de relargage significatif de [³H]5-HT par les cellules.

II.B.7. La [³H]5-HT accumulée peut fuir des granules

Etant donné que la [³H]5-HT est accumulée dans des compartiments sensibles à la réserpine, i.e. les granules chromaffines, le fait que la quantité globale de [³H]5-HT retenue par les cellules exprimant SERT diminue après une heure d'incubation suggère que la [³H]5-HT ne soit pas "emprisonnée" de manière stable dans les granules.

La possibilité d'une fuite du contenu vésiculaire a déjà été évoquée à propos des travaux sur la surexpression de VMAT2 dans différents types cellulaires (Pothos *et al.*, 2000) ainsi que dans des travaux sur VACHT (Parsons *et al.*, 1993). Cette fuite avait été également démontrée sur des préparations purifiées de vésicules synaptiques issues de cerveau de rat, chargées avec de la DA tritiée (Floor *et al.*, 1995). Dans cette étude, les auteurs avaient illustré la dynamique du pool de catécholamines contenu dans les vésicules synaptiques. La

fuite de neuromédiateur s'y fait selon un mode de décroissance exponentielle simple, caractérisée par un $t_{1/2}$ d'environ 4 minutes (à 30°C, avec $[Cl^-]_{ext} = 8$ mM, i.e. en présence de ΔpH et $\Delta \Psi$) ; cette fuite est ralentie 2 fois ($t_{1/2} = 7$ minutes) en présence de $[Cl^-]_{ext} = 90$ mM, c'est à dire par l'annulation de la composante $\Delta \Psi$. La moitié de cet efflux semble médiée par VMAT, dans la mesure où l'efflux n'est plus que de 40% du contrôle en présence de résérpine ou de tétrabénazine, deux inhibiteurs des VMAT.

Les résultats présentés dans notre étude démontrent également l'existence d'une fuite de la $[^3H]5-HT$ accumulée dans les vésicules des cellules PC12 (voir Figure 24).

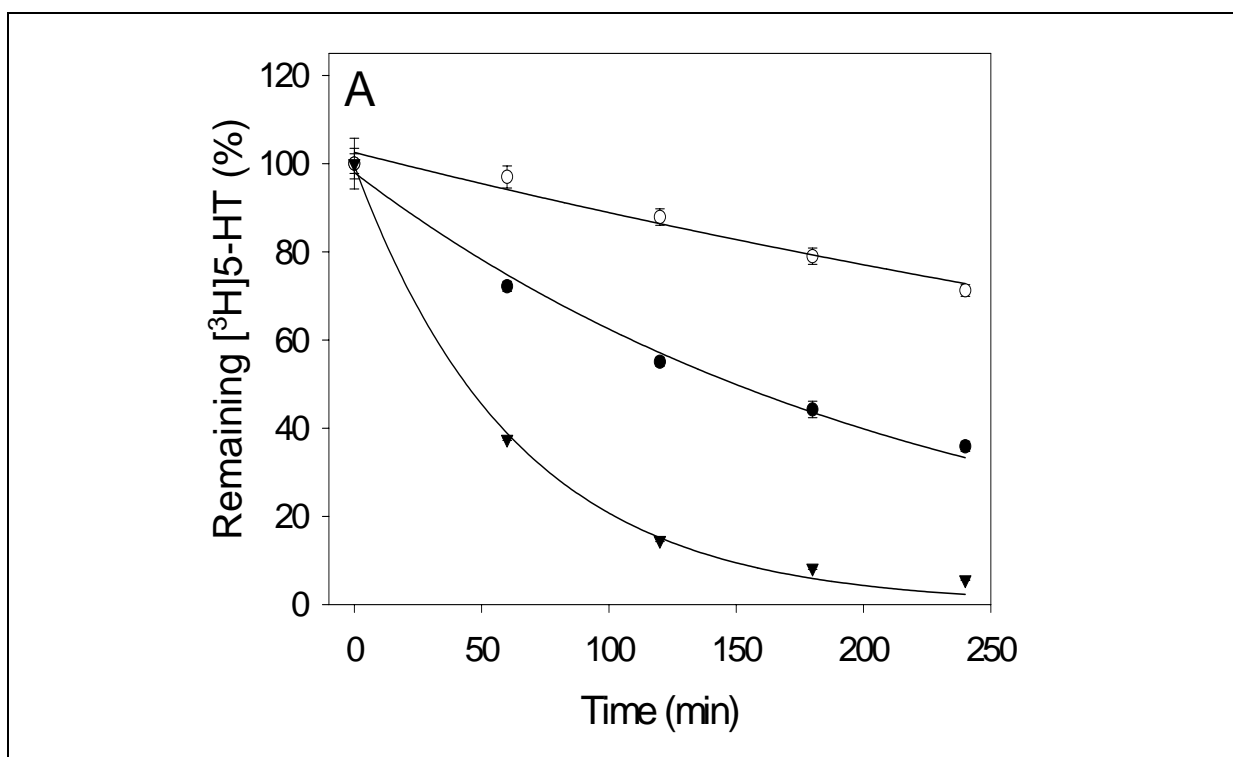


Figure 24

La $[^3H]5-HT$ accumulée dans les granules des cellules exprimant SERT peut fuir de ceux-ci ($t_{1/2} \sim 140$ minutes). Les cellules sont chargées 1 heure en présence de $[^3H]5-HT$, rincées, et la quantité d'amine restante est évaluée après un temps variable (en absence de $[^3H]5-HT$). En condition contrôle (●) i.e. en présence de clomipramine pour empêcher la réinternalisation de la $[^3H]5-HT$ sortant des cellules, la fuite est aisément détectable ($t_{1/2} \sim 140$ minutes). Celle-ci est fortement accélérée ($t_{1/2} \sim 40$ minutes) en présence de résérpine (et clomipramine, ▼) qui prévient la ré-internalisation par VMAT des molécules de $[^3H]5-HT$ fuyant du granule. À l'inverse, la décroissance est modérée ($\sim 3,6$ fois plus lente que le contrôle) lorsque la MAO-A est inhibée par la présence de pargyline (et clomipramine (○), $t_{1/2} \sim 500$ minutes), soulignant l'importance de la dégradation de la 5-HT cytosolique pour la régulation du contenu granulaire en sérotonine.

Après une charge en $[^3H]5-HT$, les quantités accumulées restantes dans les cellules sont mesurées, après des temps variables en l'absence de $[^3H]5-HT$ extracellulaire. La

décroissance du contenu total, bien apparente en condition contrôle ($t_{1/2} \sim 140$ minutes), est fortement accélérée par l'inhibition du transport de la [^3H]5-HT par VMAT ($t_{1/2} \sim 40$ minutes) ; inversement, la fuite apparente est ralentie ($t_{1/2} \sim 500$ minutes) par l'inhibition de la MAO-A.

Ainsi, les molécules de [^3H]5-HT ressortant des granules sont, en situation normale, captées à nouveau par VMAT, mais pas de manière totalement efficace : la décroissance apparente révèle que la fuite est plus importante que la recapture. Le fait que l'inhibition de la MAO-A par la pargyline diminue fortement la fuite apparente indique que les molécules de [^3H]5-HT "fuyardes" sont rapidement dégradées dans le cytosol par cette enzyme si elles ne sont pas rapidement séquestrées dans les granules de sécrétion.

On notera cependant quelques différences avec les études précédemment citées. Les résultats présentés sur la Figure 24 montrent un efflux lent de [^3H]5-HT des cellules PC12 en présence de clomipramine (afin d'empêcher la recapture de la 5-HT extrudée des cellules par SERT), avec $t_{1/2} \sim 140$ minutes. À l'inverse de l'étude précédemment citée (Floor *et al.*, 1995), l'application d'un inhibiteur des VMAT (ici, la réserpine) accélère fortement (environ 4 fois) cette fuite ($t_{1/2} \sim 40$ minutes). Ceci peut être attribué à la différence des systèmes d'étude : dans leurs études, Floor et coll. ont utilisé des préparations purifiées de vésicules synaptiques, ainsi découplées de leur interaction physiologique, directe ou indirecte, avec le métabolisme des monoamines normalement présent au sein de la cellule. Nous avons souligné, dans le paragraphe précédent, l'importance des activités des monoamine oxydases dans la dégradation rapide des monoamines (ici, la 5-HT) cytosoliques.

Dans notre étude, deux effets différents de la réserpine peuvent se combiner : d'une part, le ralentissement de l'extrusion de la 5-HT par un mécanisme dépendant de VMAT (comme observé par Floor et coll.) ; d'autre part, l'augmentation du temps de résidence dans le cytosol des molécules de [^3H]5-HT, et en conséquence leur dégradation par la MAO-A cytosolique. Si ces effets antagonistes de la réserpine sont réels, on peut souligner que le blocage de la fuite dépendant de VMAT par la réserpine est quantitativement moins important que l'effet induit sur la dégradation par la MAO-A, car la fuite apparente est plus élevée en présence de cette drogue.

Un autre paramètre crucial est également la taille et la nature des organelles considérées. En effet, la fuite est proportionnelle à la surface de membrane impliquée, tandis que le remplissage est quant à lui proportionnel au volume. Ainsi, les petits organites, comme les vésicules synaptiques, qui présentent un rapport surface/volume plus élevé que les LDCV, ont une fuite proportionnellement plus importante. Dans notre cas, les LDCV présents dans les PC12 ont des tailles d'environ 150 nm de diamètre (Greene *et al.*, 1976), soit un rapport surface/volume 3 fois plus faible qu'une vésicule synaptique typique (~50 nm de diamètre).

De plus, la présence d'une matrice protéique dense et complexe dans les granules des cellules PC12, à l'inverse des VS étudiées par Floor et coll., tend vraisemblablement à limiter l'efflux de monoamines par les interactions existantes entre celles-ci et les fonctions carboxylates des chromogranines (voir Figure 14).

II.B.8. La surexpression de SERT dans les cellules PC12 induit une augmentation de la taille quantique de 5-HT

On l'a vu, l'accumulation de [³H]5-HT dans les cellules PC12 exprimant SERT reflète un accroissement de la quantité d'amine dans les granules chromaffines (en toute rigueur, un compartiment sensible à l'action de la réserpine). Cette augmentation d'accumulation de 5-HT radiomarquée dans une population de cellules est aisément détectable avec une grande sensibilité par la technique de comptage par scintillation. Cet accroissement du transport de 5-HT, et l'accumulation dans les cellules qui s'en suit, est-il détectable par une technique de mesure directe de libération de 5-HT au niveau cellulaire ?

Nous avons auparavant utilisé la méthode de détection ampérométrique des catécholamines sur cellules chromaffines bovines isolées, et l'avions également testée pour tenter d'enregistrer des événements d'exocytose avec des cellules PC12 (voir le chapitre des matériels et méthodes pour une présentation détaillée de cette technique). Une caractéristique bien connue des PC12 est l'hétérogénéité des clones disponibles dans les nombreux laboratoires les utilisant. Cette lignée, lors de son isolation clonale il y a plus d'un quart de siècle par Greene et Tischler (Greene *et al.*, 1976), synthétisait, stockait et libérait la DA et la noradrénaline. Sur les 3 sous-clones présents au laboratoire, un seul (sous-clone "BOB") présente des événements ampérométriques, de très faible amplitude. Ce clone, très peu

adhérent au substratum de culture, n'est que rarement utilisé. Pour l'usage courant, nous lui avons préféré un autre sous-clone ("P38") nettement plus adhérent au support de culture ; ce sous-clone est, en revanche, totalement dépourvu de catécholamines endogènes (voir Figure 25).

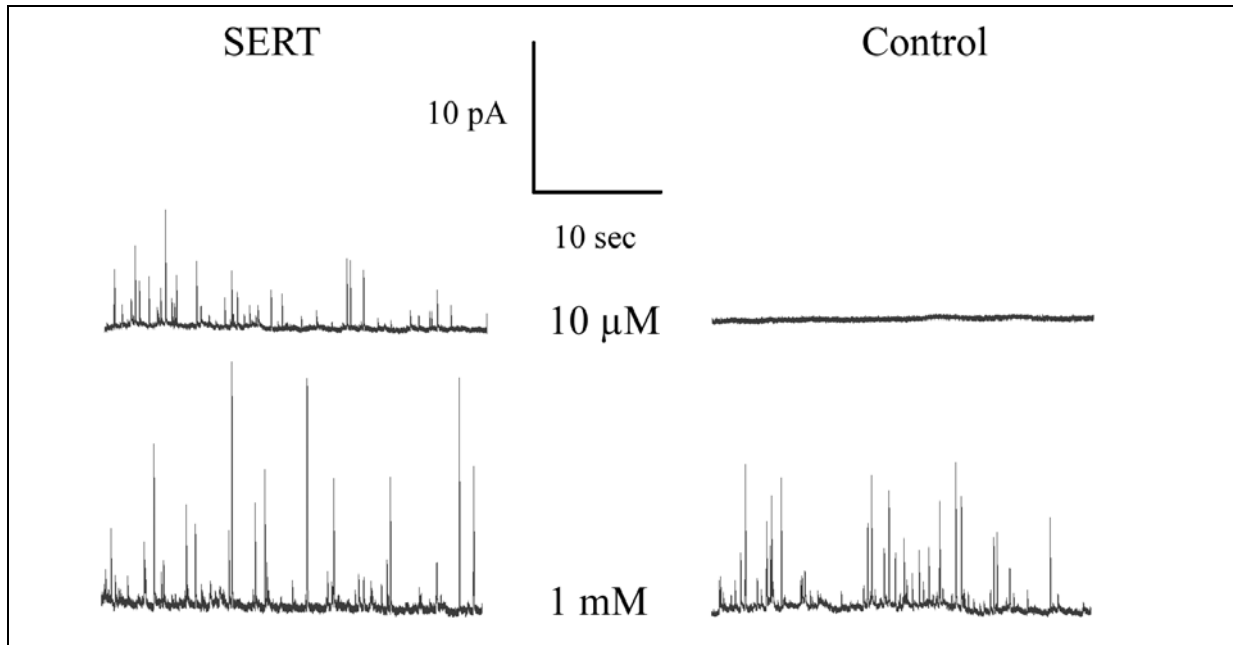


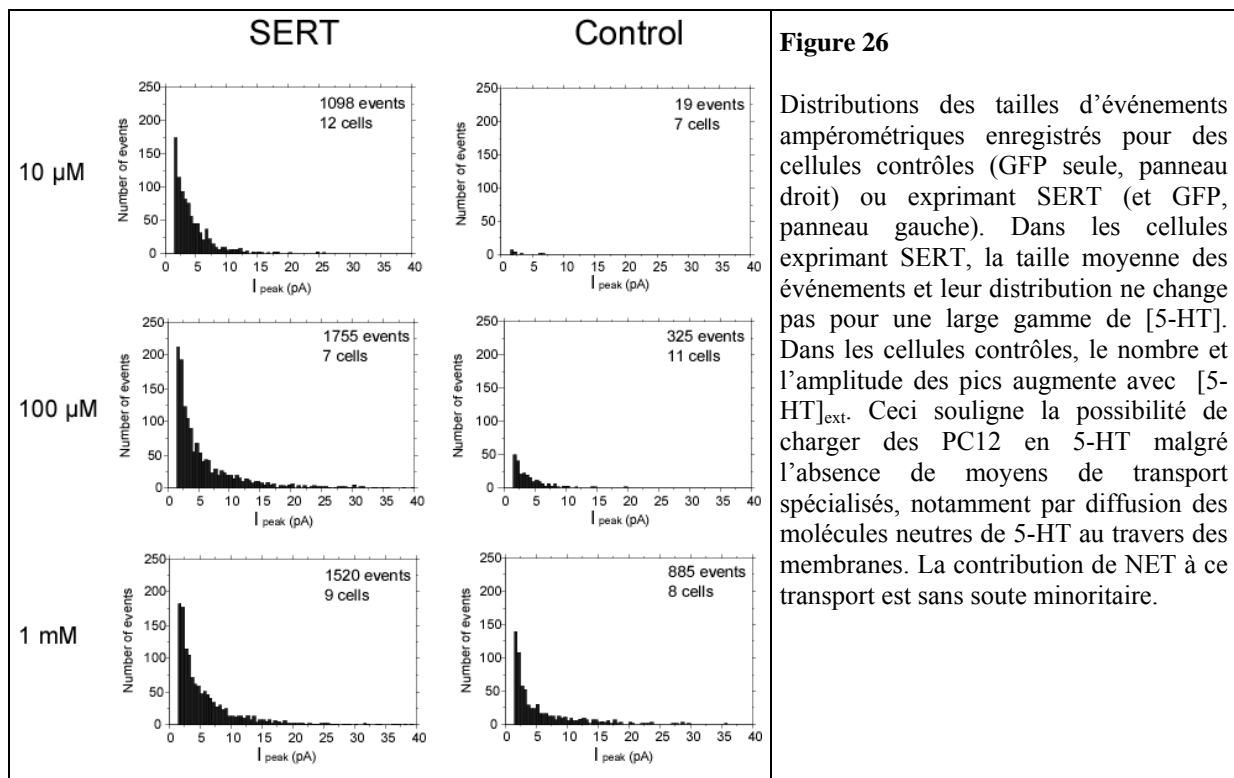
Figure 25

Après 1 heure d'incubation en présence de différentes concentrations de [5-HT] extracellulaire, des cellules individuelles ont été stimulées par application locale d'une solution de Locke dépolarisante (55 mM K^+). Les cellules contrôles (exprimant uniquement la GFP), ne présentent aucune activité détectable pour de faibles (10 μ M) [5-HT]ext. Les cellules exprimant SERT (et la GFP) présentent en revanche une activité ampérométrique quasi maximale dès 10 μ M de 5-HT, correspondant au K_m de SERT.

Nous avons tiré avantage de cet apparent inconvénient pour détecter une augmentation de la taille quantique en 5-HT par expression de SERT. Les événements ampérométriques, inexistant dans les cellules PC12 naïves après incubation avec de faibles concentrations de 5-HT (10 μ M, soit proche du K_m de SERT pour la 5-HT) sont déjà aisément détectables avec les cellules exprimant SERT (repérées grâce à l'expression simultanée de la EGFP ; voir plus loin pour une discussion sur l'efficacité de co-transfection).

De façon prévisible, aucune différence significative n'est observée entre les distributions de populations de taille des pics ampérométriques observées dans les cellules SERT pour une large gamme de [5-HT] extracellulaire au-dessus du K_m de SERT pour la sérotonine.

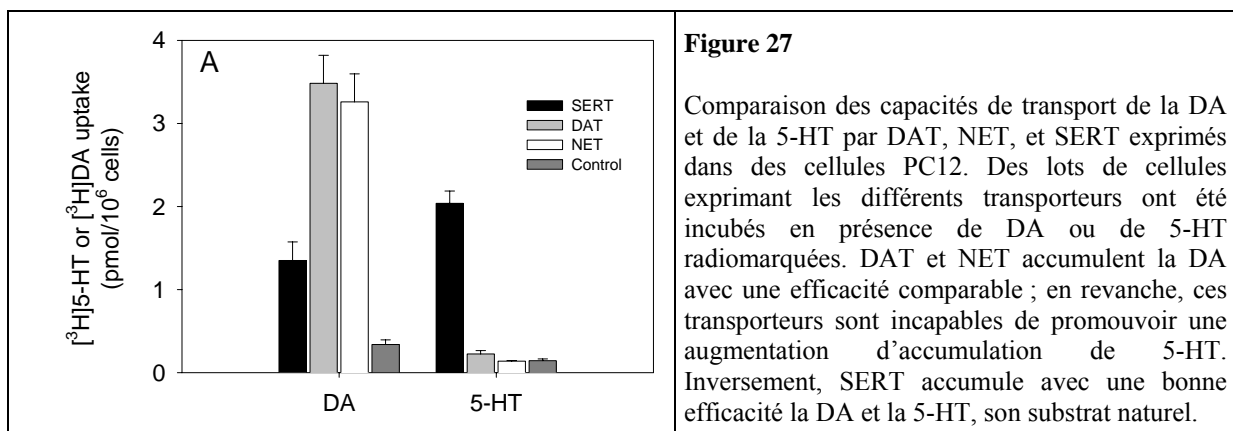
En revanche, la quantité d'événements détectables dans les cellules témoins (GFP seule) croît avec $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$. Même à forte concentration (1 mM), les pics observés ont une taille moyenne inférieure à celle des événements observés dans les cellules exprimant SERT. La charge des cellules témoins en 5-HT malgré l'absence de SERT endogène est néanmoins possible grâce à la présence de NET dans ces cellules et, vraisemblablement pour une part importante, à la diffusion au travers des membranes lipidiques (plasmique puis granulaire) de molécules neutres de 5-HT.



L'augmentation du nombre d'événements ampérométriques observée après expression de SERT dans les cellules PC12 traduit, très vraisemblablement, une augmentation de la quantité de 5-HT stockée dans les granules sécrétoires. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que la présence de SERT augmente, par exemple, le nombre de granules compétents pour la fusion, ce qui conduirait au même type d'observation (plus d'événements ampérométriques dans les cellules SERT pour une $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ donnée).

Nous avons donc mesuré l'activité sécrétrice de cellules (contrôles et exprimant SERT) après une charge en DA plutôt qu'en 5-HT. Cette méthode a été proposée pour

permettre des analyses ampérométriques dans les cellules PC12 où le faible niveau de catécholamines endogènes rendait celles-ci difficiles, voire impossibles (Fisher *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000). Après incubation en présence d'une forte concentration de DA (1 mM, 1 heure), les activités ampérométriques mesurées sont très similaires dans les deux groupes de cellules enregistrées (cellules SERT, $0,46 \pm 0,07$ Hz ; moyenne \pm ES, n=12 ; cellules contrôles, $0,37 \pm 0,13$ Hz ; moyenne \pm ES, n=12). La fréquence légèrement supérieure observée avec les cellules SERT (+24% comparée au contrôle, mais non significative) peut être imputée à la meilleure capture de DA dans ces cellules, du fait que SERT transporte également la DA (voir Figure 27).



En conclusion, l'expression de SERT accroît le nombre d'événements ampérométriques mesurés après une charge de 5-HT, en augmentant sa concentration intravésiculaire, et sans modifier la machinerie d'exocytose.

II.B.9. Le niveau de remplissage en monoamines des vésicules résulte d'un équilibre complexe

Pendant longtemps, la quantité de NT par VS (le quantum vésiculaire) a été considérée comme relativement invariante. Des données relatives à l'existence d'une fuite vésiculaire et à l'importance de la dégradation des monoamines par les MAO ont été rapportées, essentiellement dans des modèles neuronaux. Les données présentées ici illustrent l'existence de ces mêmes paramètres dans la lignée PC12, très utilisée pour l'étude des mécanismes de sécrétion régulée. L'ensemble de ces résultats montre bien que le niveau de remplissage des vésicules en neuromédiateur (ici la 5-HT) résulte d'un équilibre complexe, avec de nombreux

points de régulation possibles, comme les activités de transports plasmique et vésiculaire des neuromédiateurs (incluant les régulations indirectes, comme celles de certains flux ioniques participant aux transports), le niveau cytosolique en neuromédiateur (synthèse, dégradation), l'efficacité de sa rétention dans l'organite sécrétoire (fuite, présence d'une matrice protéique favorisant sa rétention), et les dimensions de l'organite (affectant le rapport S/V, donc l'équilibre fuite/remplissage).

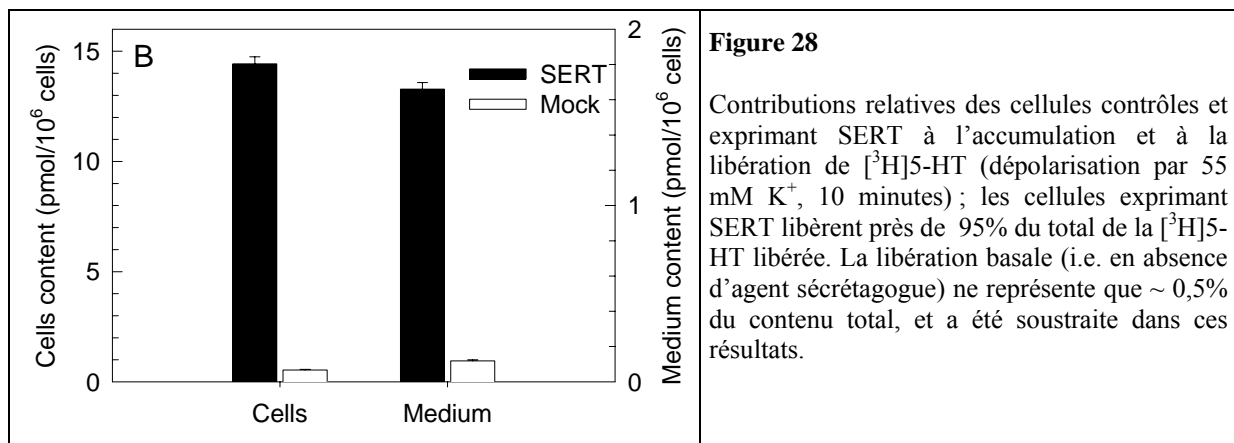
II.B.10. Cinétique ou thermodynamique ?

Un point de controverse a pendant longtemps agité le microcosme de la recherche sur les mécanismes du remplissage vésiculaire en NT. Du fait que les VMAT (comme les autres transporteurs vésiculaires de NT) convertissent "simplement" le gradient de pH en gradient de monoamines, le niveau de remplissage des vésicules ne devrait alors dépendre que des paramètres thermodynamiques du transporteur (et du niveau de monoamines disponibles dans le cytosol). Autrement dit, un granule comportant un seul VMAT devrait théoriquement atteindre le même niveau de remplissage qu'un autre en possédant 10 ou 100. Pour information, le nombre de molécules de VMAT présentes à la surface d'un granule chromaffine est estimé à ~20 (Henry *et al.*, 1998), avec un turnover lui-même estimé à 140 molécules transportées par minute (Gasnier *et al.*, 1987). Pour un granule chromaffine moyen (270 nm de diamètre), et en adoptant les paramètres évoqués plus haut, le temps pour remplir un granule vide typique serait d'environ 20 heures, une durée compatible avec les observations expérimentales. Un transporteur unique par granule assurerait théoriquement la même concentration finale, en un peu plus de 15 jours ! La nécessité d'avoir un nombre plus élevé de copies semble donc évident pour répondre à une consommation importante de granules par la cellule. Mais ce nombre est-il suffisant pour atteindre l'équilibre thermodynamique ? Les divers arguments démontrant l'existence d'une fuite vésiculaire importante, dans nos résultats et des études précédentes, notamment la régulation de la taille quantique par augmentation ou diminution de la quantité de VMAT présent sur les granules, montre que, de fait, le contrôle de la taille quantique est plus cinétique que thermodynamique, les transporteurs devant compenser en permanence la fuite vésiculaire des neuromédiateurs. Cette fuite, dont l'origine physique est mal connue (transport inverse par VMAT, diffusion membranaire, pore ?) est quantitativement d'autant plus importante qu'on considère de petits

organites (les VS), où le rapport surface/volume devient défavorable, et qui ne contiennent pas de matrice protéique apte à chélater efficacement le neuromédiateur.

II.C. L'expression des transporteurs plasmiques des monoamines : un outil pour la mesure de l'activité sécrétrice des cellules PC12

La forte augmentation de la capture de [³H]5-HT par les cellules PC12 exprimant SERT, et l'adressage correct de cette [³H]5-HT dans les granules sécrétoires sont deux points importants qui nous permettaient d'utiliser sa mesure comme rapporteur de l'activité sécrétrice de la sous-population de cellules transfectées. Le rapport signal/bruit est excellent, comme l'illustre la Figure 28 ; Ainsi, plus de 95% de la [³H]5-HT sécrétée par une population mixte de cellules provient de la minorité (~1/5^{ème}) de cellules transfectées.



II.C.1. L'expression de SERT n'affecte pas la sensibilité de la machinerie d'exocytose vis-à-vis du calcium

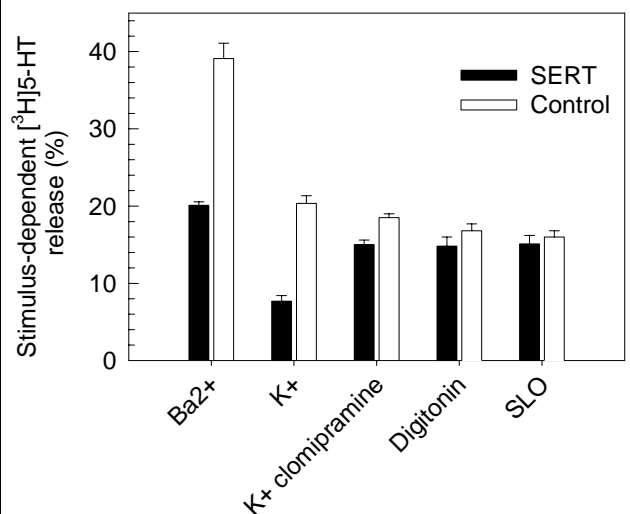
Dans l'objectif d'utiliser la co-expression de SERT pour mesurer l'effet de protéines sur l'exocytose, il était indispensable d'évaluer les effets éventuels de cette expression sur le paramètre mesuré lui-même (l'activité sécrétrice), d'autant plus que l'activité de SERT semble lié aux flux calciques (voir plus haut les mécanismes de régulation de SERT). Nous avons ainsi comparé les capacités sécrétrices de cellules contrôles et exprimant SERT avec

divers sécrétagogues (Figure 29). La première observation marquante est la diminution apparente de la fraction libérable de [³H]5-HT par les cellules exprimant SERT lors d'une dépolarisation (10 minutes, 55 mM K⁺). Il s'avère en fait que cela n'est dû qu'à la recapture rapide par SERT d'une fraction de la [³H]5-HT libérée durant l'exocytose. L'ajout de clomipramine durant la stimulation, par l'inhibition de SERT qui en résulte, suffit à corriger cette baisse apparente d'activité sécrétoire. L'expression de SERT, durant les 3 à 4 jours qui précèdent l'analyse de la sécrétion, n'interfère pas avec les processus conférant la sensibilité calcique de l'exocytose régulée. En effet, après perméabilisation de la membrane plasmique (digitonine, streptolysine-O ou α -toxine), la réponse sécrétoire des cellules exprimant SERT est identique à celle des cellules contrôles, pour des concentrations de calcium libre comprises entre 0,1 et 100 μ M. Ici, aucune baisse de la fraction libérée apparente n'est visible, du fait de la mise en continuité des compartiments intra- et extra-cellulaires ; ainsi, les molécules de [³H]5-HT libérées par exocytose et éventuellement recaptées par SERT peuvent rapidement rediffuser vers l'extérieur de la cellule par les pores formés lors de la perméabilisation.

Figure 29

Comparaison des activités sécrétoires de cellules contrôles et exprimant SERT avec différents sécrétagogues.

L'apparente diminution d'activité sécrétoire par les cellules SERT est due à une recapture simultanée d'une partie de la [³H]5-HT libérée, corrigée par l'adjonction de clomipramine. Les activités sécrétoires mesurées après perméabilisation de la membrane plasmique sont identiques pour les cellules exprimant SERT et les cellules contrôles.



On pourra noter la remarquable stimulation de l'activité sécrétoire induite par les ions Ba²⁺ (ici, en absence de clomipramine, d'où l'apparente baisse de la fraction libérée par les cellules SERT par rapport au contrôle). Les ions Ba²⁺ ont été décrits comme pouvant mimer l'action des ions Ca²⁺ sur la machinerie d'exocytose. Lors d'une dépolarisation, c'est l'ouverture de canaux calciques sensibles au potentiel de membrane qui permet l'entrée massive des ions Ca²⁺. Les ions Ba²⁺ pénètrent les cellules par ces mêmes canaux, mais provoquent aussi indirectement leur ouverture ; en effet, le Ba²⁺ bloque les canaux K⁺,

entraînant une dépolarisation de la cellule, et donc l'ouverture des canaux calciques. La possibilité que le Ba^{2+} pénètre la cellule via les récepteurs canaux sensibles à la nicotine (quand ceux-ci sont présents, comme dans les cellules chromaffines, et activés par la liaison de l'agoniste) a également été démontrée (Forsberg *et al.*, 1988).

La cinétique d'action du baryum sur l'exocytose a été mesurée par ampérométrie sur des cellules chromaffines. Typiquement, son temps d'action est d'environ 15 secondes avant l'apparition des premiers signaux ampérométriques. Cette cinétique lente n'est pas seulement due au délai imposé par la dépolarisation membranaire. En effet, Seward et coll. ont démontré que le Ba^{2+} , introduit directement par la pipette de patch ou par dépolarisation électrique de la membrane induisait également une réponse sécrétrice plus lente que les ions Ca^{2+} , mais soutenue dans le temps (Seward *et al.*, 1996).

De plus, le mode d'action du Ba^{2+} semble assez distinct de celui des ions Ca^{2+} si l'on considère par exemple que les ions Ba^{2+} stimulent l'exocytose sans activer la calmoduline (Verhage *et al.*, 1995), un événement considéré comme important lors de la stimulation par les ions Ca^{2+} . D'autre part, la stimulation par le Ba^{2+} semble beaucoup moins sujette à l'inactivation que celle par le Ca^{2+} (qui doit amener la fin de la réponse sécrétrice), pour diverses raisons ; citons par exemple la capacité du Ba^{2+} à auto-entretenir la dépolarisation cellulaire par blocage des canaux potassiques, sa forte perméation par des canaux Ca^{2+} non inactivables, sa faible inactivation cytosolique du fait de sa mauvaise affinité pour les mécanismes d'extrusion plasmiques (Neves *et al.*, 2001) ainsi que sa capacité à libérer les stocks intracellulaires de Ca^{2+} .

L'ensemble de ces caractéristiques contrebalance la mauvaise affinité apparente de l'appareil sécrétoire pour les ions Ba^{2+} , environ 100 fois moins bonne que pour le Ca^{2+} (Von Ruden *et al.*, 1993). De plus, les ions Ba^{2+} n'activent pas des réponses sécrétrices identiques dans tous les types cellulaires excitables : alors que deux phases cinétiques distinctes sont visibles dans les cellules chromaffines, une seule est apparente dans des neurones hypophysaires (Seward *et al.*, 1996). Dans la même ligne d'idée, le Ba^{2+} discrimine les phases rapides et lentes de la sécrétion dans les cellules chromaffines : alors que l'amplitude de la phase rapide est diminuée de 90% par le Ba^{2+} , la phase lente ne semble pas affectée (Neves *et al.*, 2001).

Récemment, une très élégante étude basée sur la modification de couleur de fluorescence d'une protéine en fonction de son "âge", a permis de montrer que le Ba^{2+} , contrairement au Ca^{2+} , stimulait l'exocytose de granules anciennement formés préférentiellement aux granules jeunes (Duncan *et al.*, 2003). Ainsi, l'étude du mode d'action, *a priori* non physiologique, de cet ion peut apporter d'importants éclairages sur les mécanismes de libération dépendant du Ca^{2+} , mais son utilisation est délicate et ses effets sont relativement indirects, ce qui rend son usage en routine à proscrire.

II.C.2. Efficacité de co-transfection

La mesure de la libération de [3H]5-HT par une population contenant des cellules PC12 exprimant SERT permet d'accéder à la mesure de l'activité sécrétoire de ces dernières ; il est ainsi possible de déterminer facilement l'effet d'une protéine quelconque sur ce paramètre, à condition que les cellules possédant SERT expriment également la protéine exogène en question. Le moyen le plus sûr d'y aboutir est d'utiliser un vecteur plasmidique unique, comportant les gènes codant SERT et celui de la protéine d'intérêt. Cependant, dans l'objectif de tester un grand nombre de protéines candidates pour jouer un rôle dans l'exocytose, il était bien entendu plus intéressant d'utiliser 2 vecteurs séparés, l'un codant SERT, l'autre la protéine étudiée. Nous avons ainsi dû nous assurer de l'efficacité du processus de co-transfection.

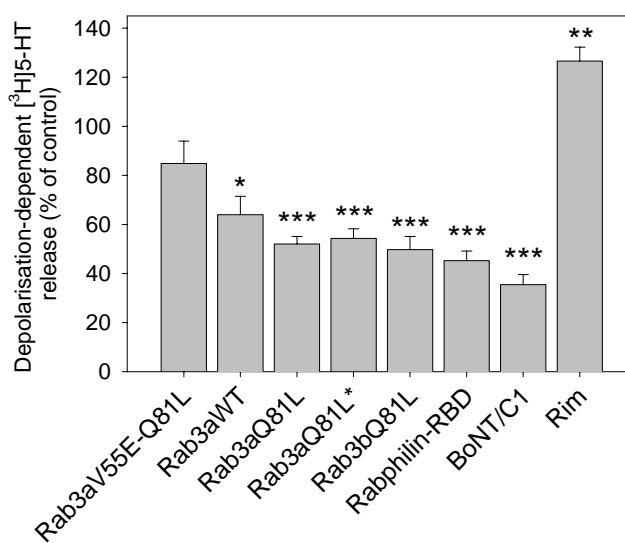
Plusieurs études ont montré qu'une cellule "acceptant" un plasmide reçoit également l'autre, en cas de double transfection. Effectivement, des comptages de cellules co-transfectées (exprimant à la fois la GFP et la DsRED, un équivalent "rouge" de GFP) montre que >95% des cellules exprimant la DsRED expriment également la GFP, en accord avec des études précédemment publiées (Fisher *et al.*, 1999). L'usage en routine de 2 plasmides distincts pour la mesure de la libération de [3H]5-HT est donc possible, avec une "pollution" mineure du signal par des cellules mono-transfectées.

II.C.3. Validation du test de libération de [³H]5-HT

L'aptitude de ce test basé sur la coexpression de SERT à détecter les effets potentiellement inhibiteurs ou activateurs sur la sécrétion a été évaluée à l'aide de protéines aux effets bien documentés dans la littérature. Trois à 4 jours après la transfection, les cellules exprimant SERT et diverses protéines ont été chargées en [³H]5-HT, lavées, et leur capacité sécrétoire évaluée par stimulation en présence d'une solution dépolarisante (55 mM K⁺, 10 min, voir Figure 30). L'activité sécrétrice est rapportée en % du contrôle (activité sécrétrice de cellules cotransfectées par les vecteurs d'expression de SERT et de la GFP ou bien un vecteur d'expression vide). L'absence de différence entre les activités sécrétrices de cellules PC12 exprimant SERT+GFP et celles n'exprimant que SERT indique que la GFP n'interfère pas avec le processus sécrétoire. De même, la procédure de transfection (par lipofection, voir le chapitre des matériels et méthodes) n'affecte pas la sécrétion des cellules transfectées (données non montrées).

Figure 30

Effet de diverses protéines sur la capacité sécrétrice de [³H]5-HT de cellules coexprimant SERT. L'activité sécrétrice dans chaque condition est présentée en % de l'activité sécrétrice du groupe de cellules contrôles (population de cellules coexprimant SERT et la GFP, ou SERT et un vecteur vide;). Les effets inhibiteurs (Rab3a & b, BoNT/C1, domaine RBD de la Rabphiline) ou activateurs (RIM) déjà caractérisés par le biais d'autres techniques sont fidèlement reproduits. On notera que l'emploi de 2 vecteurs distincts dans le cas du mutant Rab3aQ81L (SERT et Rab3Q81L codés par 2 plasmides différents) ou d'un seul vecteur conduisant l'expression des 2 protéines (Rab3aQ81L*) donne des résultats comparables, validant la possibilité d'une co-expression efficace par l'usage de vecteurs plasmidiques séparés.



Les co-expressions simultanées de SERT avec la forme sauvage de Rab3a (Rab3aWT), ainsi que les formes mutantes dépourvues d'activité d'hydrolyse du GTP de Rab3a (Rab3aQ81L) et Rab3b (Rab3bQ81L) induisent une baisse significative de l'activité sécrétrice des cellules PC12, en accord avec de nombreuses études sur ces protéines (Holz *et*

al., 1994; Johannes *et al.*, 1994; Iezzi *et al.*, 1999). Ces résultats, obtenus avec des transfections réalisées grâce à 2 vecteurs indépendants (un pour l'expression de SERT, l'autre pour chaque protéine étudiée) sont parfaitement reproduits avec un vecteur unique, conduisant l'expression des 2 produits de gènes placés sous le contrôle de promoteurs distincts (Rab3aQ81L*), confirmant l'excellent degré de co-transfection atteint. On notera de façon intéressante qu'un double mutant de Rab3a, à la fois dénué d'activité d'hydrolyse du GTP (mutation Q81L) et de la capacité à lier certains de ses effecteurs (mutation V55E, dans la boucle dite effectrice ; voir le chapitre sur Rab3 pour plus de détails) ne provoque pas de modification significative de l'activité sécrétrice des cellules PC12, comme cela avait déjà été montré dans les neurones cholinergiques de l'aplysie (Johannes *et al.*, 1996). Ce point sera rediscuté dans la partie consacrée à Rab3.

Le domaine de liaison à Rab3 (RBD, Rab Binding Domain) de la Rabphiline, un effecteur des protéines Rab3, a lui aussi été décrit comme étant inhibiteur sur la sécrétion (Chung *et al.*, 1995) ; de même, l'effet fortement inhibiteur de la toxine botulinique C1 dans les cellules chromaffines et PC12 (Foran *et al.*, 1996; Fisher *et al.*, 1999), qui exerce son action inhibitrice en clivant la syntaxine et SNAP-25, deux composants essentiels du complexe SNARE, est retrouvé grâce à cette technique.

Enfin, l'expression de RIM, un autre effecteur des Rab3 (Wang *et al.*, 1997a), induit une augmentation significative de la sécrétion, comme déjà observé par l'utilisation du test de sécrétion basé sur la coexpression de la hGH (Sun *et al.*, 2001). L'observation d'effets stimulateur sur l'exocytose (par RIM) et inhibiteurs (par Rab3a & b, BoNT/C1, fragment RBD de la rabphiline) limite la possibilité que ces effets soient purement artefactuels, dus par exemple à une interférence des protéines considérées avec le trafic de SERT.

II.C.4. Robustesse du test

Plusieurs paramètres contribuent à l'efficacité et la robustesse d'un test. Nous avons voulu nous assurer que les résultats obtenus avec le test que nous décrivions étaient fiables et peu sensibles à de légères variations de conditions expérimentales.

Ainsi, la qualité du signal (i.e. l'augmentation de capture de [³H]5-HT par expression de SERT) doit idéalement être stable malgré des altérations des conditions de transfection et de charge en [³H]5-HT, notamment.

II.C.4.a. Relative invariance vis-à-vis de la quantité de vecteur codant SERT

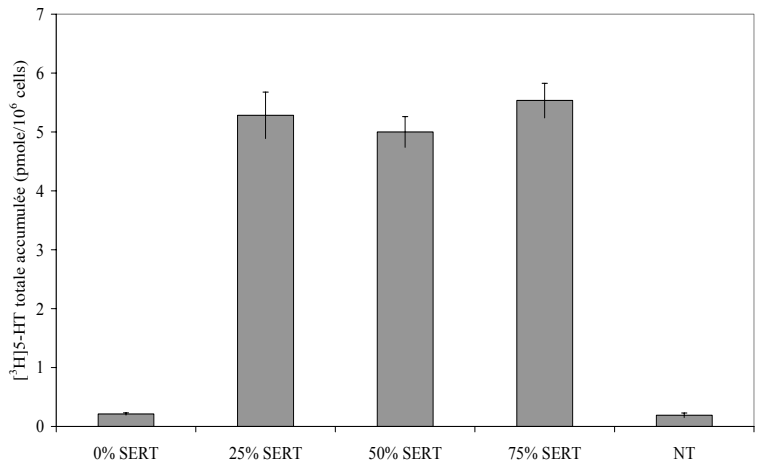
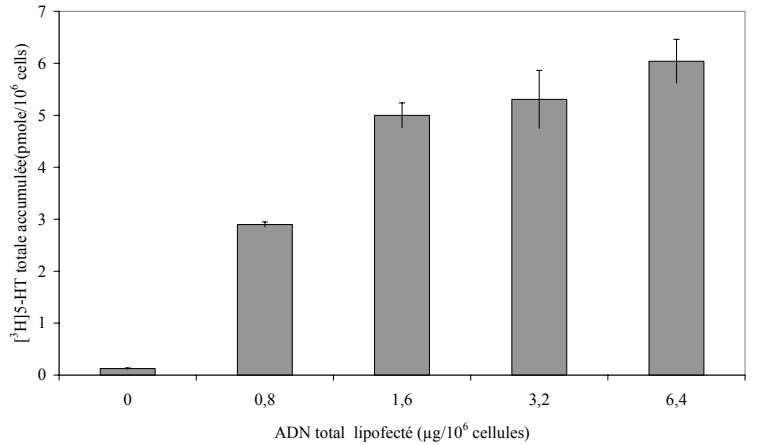
De fait, des variations de la quantité de plasmide codant SERT utilisée lors de la transfection n'ont que peu de répercussions sur la capacité d'accumulation de la [³H]5-HT le jour de l'expérimentation (voir Figure 31 et Figure 32) ; une accumulation optimale de [³H]5-HT est atteinte pour de faibles quantités de vecteur codant SERT (jusqu'à 0,4 µg de vecteur/10⁶ cellules). Cette confortable marge permet ainsi une assez grande liberté pour le choix des quantités des vecteurs codant les protéines d'intérêt, afin d'obtenir des conditions optimales de surexpression.

Figure 31

Evolution de la capacité d'accumulation de cellules PC12 exprimant SERT en fonction de la quantité de vecteur pCMV-rSERT lipofecté. Des quantités variables d'un mélange contenant la même proportion de vecteur pCMV-rSERT et de vecteur vide (pcDNA3) ont été utilisées pour transfecter des cellules PC12 (le ratio ADN/lipofectant étant fixé). Quatre jours après la transfection, la capacité d'accumulation de [³H]5-HT a été testée. Un quasi-plateau est observé à partir de 1,6 µg d'ADN total (soit 0,8 µg de vecteur pCMV-rSERT/10⁶ cellules). C'est cette dernière condition qui a été retenue pour l'utilisation en routine du test de sécrétion.

Figure 32

Evolution de la quantité totale de [³H]5-HT capturée en 1 heure lors de variations de la quantité d'ADN SERT utilisée pour la lipofection, dans une gamme balancée pCMV-rSERT/pEGFP (quantité globale d'ADN fixée à 1,6 µg d'ADN/10⁶ cellules). La modification du ratio des vecteurs pCMV-rSERT/pEGFP ne modifie que peu la capacité finale des cellules à accumuler la [³H]5-HT ; ainsi, le système de transport est rapidement saturant pour de faibles quantités de vecteur codant SERT, assurant ainsi une bonne reproductibilité des expériences. La marge ainsi dégagée permet une grande flexibilité dans le choix des quantités du vecteur codant l'éventuelle protéine d'intérêt pour aboutir à une surexpression optimale. NT : cellules non transfectées.

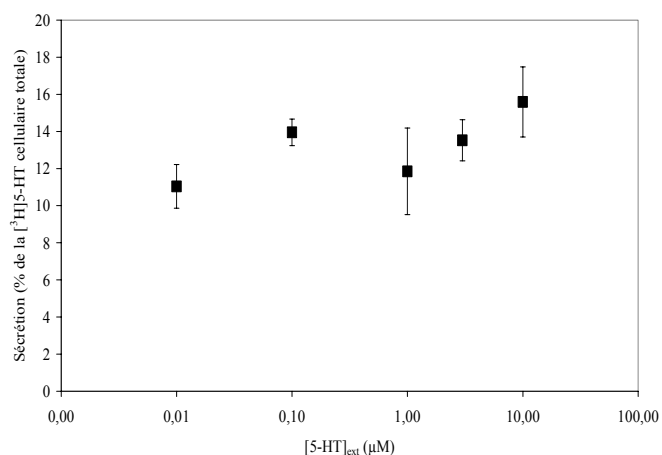


II.C.4.b. Relative invariance vis-à-vis de la concentration extracellulaire en [³H]5-HT

La concentration usuelle de [³H]5-HT extracellulaire adoptée au moment de la charge (~100 nM) est dans une gamme bien inférieure au K_m de SERT pour la 5-HT (~10 µM). Néanmoins, une très large gamme de concentrations de [³H]5-HT (de 10 nM à 10 µM) a pu être balayée sans affecter sensiblement les capacités sécrétrices des cellules (voir Figure 33).

Figure 33

Influence des variations de la concentration de [³H]5-HT extracellulaire lors de la charge sur l'activité sécrétrice des cellules PC12 surexprimant SERT. Les cellules ont été chargées (1h, 37°C) en présence de concentrations variables de 5-HT (non marquée isotopiquement) additionnée de [³H]5-HT à dose traçante (10 nM). Après lavages et chasse d'une heure, la capacité sécrétrice des cellules a été déterminée par stimulation de l'exocytose par une solution dépolarisante (10 min, 55 mM K⁺). L'activité sécrétrice exprimée est la fraction libérée de la [³H]5-HT totale contenue dans les cellules à l'issue de la chasse.



II.C.4.c. Relative invariance vis-à-vis du temps de capture de [³H]5-HT

Nous avons vu précédemment que la quantité totale de [³H]5-HT accumulée par les cellules surexprimant SERT croît (jusqu'à ~1h) puis décroît régulièrement au cours du temps. Nous nous sommes assurés que l'activité sécrétrice était indépendante de la charge totale des cellules en [³H]5-HT en réalisant des captures de durée variable, suivies de lavages et d'une chasse de durée fixe (1 h). À l'issue de la chasse, la capacité sécrétrice des cellules a été mesurée (55 mM K⁺, 10 min, voir Figure 34 et Figure 35).

Figure 34

Evolution de l'accumulation cellulaire totale de [³H]5-HT en fonction du temps de charge. Après un temps variable de charge, les cellules ont été brièvement rincées, et la radioactivité totale mesurée après une chasse additionnelle d'une heure en l'absence de [³H]5-HT. Comme précédemment décrit, la quantité de [³H]5-HT capturée croît pour des temps de capture jusqu'à une heure, puis décroît lentement en fonction du temps.

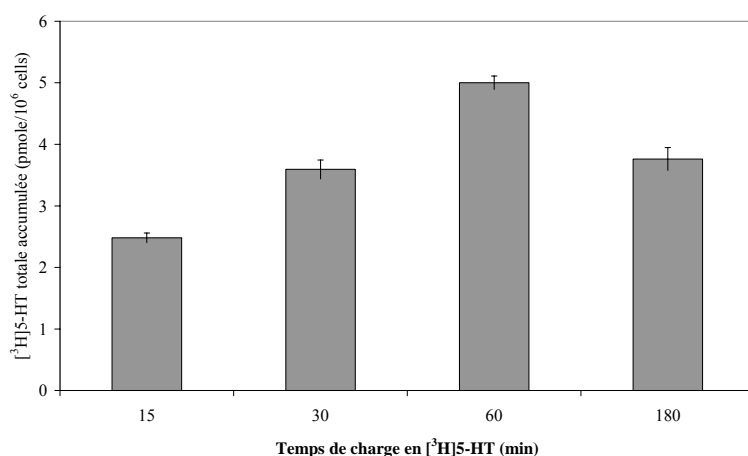
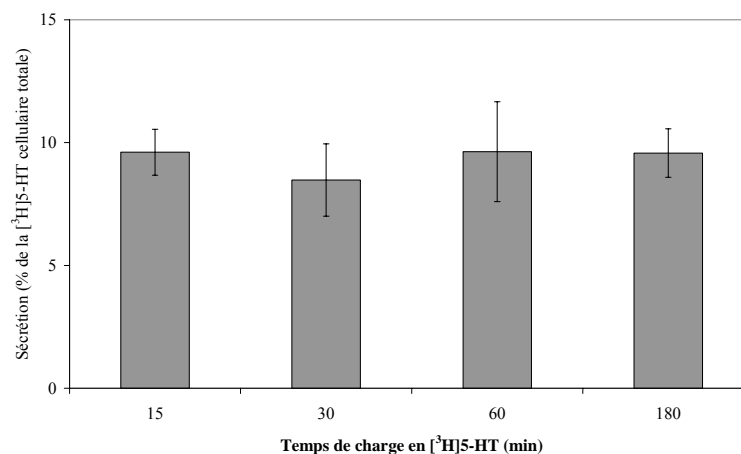


Figure 35

Détermination de la capacité sécrétrice en [³H]5-HT après un temps variable de charge (voir légende de la figure précédente). La quantité libérée de [³H]5-HT en 10 minutes (55 mM K⁺) est rapportée à la quantité totale dans les cellules. Malgré les variations de la charge totale en [³H]5-HT au cours du temps, la fraction libérée demeure constante.



II.C.5. Conclusions – Avantages du test de mesure de l'activité sécrétrice basé sur la co-expression de SERT

L'étude des mécanismes sous-tendant la sécrétion régulée des hormones et des NT nécessite souvent la perturbation de ces mécanismes par la surexpression, dans des modèles cellulaires variés, de protéines exogènes sous leurs formes sauvages ou mutantes. La lignée PC12 est un modèle cellulaire souvent utilisé pour ces études. La plupart des techniques disponibles pour l'étude de l'activité sécrétoire, et la détermination de l'impact éventuel de protéines étudiées, nécessite souvent des savoir-faire et des appareillages complexes, comme dans le cas des mesures électrophysiologiques sur des cellules isolées. L'investissement humain et financier nécessité par ce type d'approche, ainsi que la complexité des méthodes, les rendent difficilement accessibles pour des laboratoires non spécialisés. Il existe donc un réel besoin de méthodologies simples, rapides à mettre en œuvre et peu coûteuses pour tester l'impact éventuel d'une protéine sur le processus sécrétoire. C'est dans ce but que la technique populaire de co-expression de la hGH dans les cellules PC12 (et également les cellules chromaffines) fut élaborée il y a une dizaine d'années (Wick *et al.*, 1993). Cette technique possède *a priori* l'essentiel des critères nécessaires à la détection rapide d'un effet d'une protéine donnée sur la sécrétion, mais pour les raisons évoquées précédemment dans ce chapitre, il nous semblait intéressant de rechercher d'autres moyens, plus reproductibles et moins coûteux, d'arriver à ce résultat dans les cellules PC12.

Les données présentées dans notre étude montrent que la technique développée par nos soins présente de nombreux avantages. D'une part, l'activité utilisée comme rapporteur est une activité physiologique de ces cellules (accumulation et libération de monoamines). D'autre part, l'activité reportrice est virtuellement indépendante de la concentration de [³H]5-HT dans le test, du temps de charge, et peu dépendante de faibles variations du taux d'expression de SERT. Par ailleurs, la technique de mesure de la [³H]5-HT (comptage des émissions β par scintillation liquide) est sensible, précise et non saturable. Un avantage supplémentaire de cette approche est la possibilité de mener des études à la fois au niveau d'une population entière (charge en [³H]5-HT) et également par caractérisation de l'activité sécrétrice de cellules isolées (charge en 5-HT "froide", cette molécule étant oxydable donc détectable par analyse ampérométrique), réduisant ainsi les biais inhérents aux comparaisons de données acquises dans des systèmes biologiques différents. L'aspect économique du test est également avantageux, dans la mesure où la "matière première" (la [³H]5-HT) est un produit commercialement disponible à un prix réduit. Le seul appareillage important nécessaire à la conduite du test (un compteur β à scintillation) est disponible dans la quasi-totalité des instituts de biologie. À titre indicatif, le coût d'un point de mesure est environ 15 à 20 fois moindre que dans le test de sécrétion de la hGH. Nous avons donc par la suite adopté cette technique de mesure de l'activité sécrétrice au niveau des populations de PC12 comme technique principale.

Transmitter uptake and release in PC12 cells overexpressing plasma membrane monoamine transporters

Jean-Sébastien Schonn, Claire Desnos, Jean-Pierre Henry and François Darchen

CNRS UPR 1929, Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris, France

Abstract

Transmitter uptake and exocytosis of secretory vesicles are two essential aspects of neurotransmission. Here we show that transient overexpression of plasma membrane monoamine transporters in rat pheochromocytoma PC12 cells induced an approximate 20-fold enhancement of cellular uptake of monoamines. Intravesicular amine concentration was greatly increased, as demonstrated directly by carbon fibre amperometry. However, the amount of stored monoamines diminished over a 5-h period, unless monoamine oxidase was inhibited, indicating that monoamines leak out from secretory vesicles. This efflux of monoamines accounts for the reported dependence of vesicular monoamine content (the quantal size) on the kinetics of vesicular monoamine uptake. Measuring radiolabelled monoamines release from the cell

population provided accurate determination of the secretory activity of the subpopulation (10–20%) of cells transfected with monoamine transporters, since they contained about 95% of the radiolabel. Accordingly, significant modification of the secretory responses was observed, at the cell population level, upon transient expression of the serotonin transporter and of proteins known to interfere with exocytosis, such as botulinum neurotoxin C1, GTPase-deficient Rab3 proteins, truncated Rabphilin constructs or Rim. The co-transfection assay described here, based on transient expression of monoamine transporters, should prove useful in functional studies of the secretory machinery.

Keywords: amperometry, catecholamine, exocytosis, PC12 cells, quantal size, transporter.

J. Neurochem. (2003) **84**, 669–677.

Hormones and neurotransmitters are stored within secretory vesicles and released by exocytosis in response to a rise in intracellular Ca^{2+} concentration. A complex molecular machinery ensures the motion of vesicles toward the cell periphery, their docking to the plasma membrane and their fusion with the plasma membrane upon arrival of a stimulus (Jahn and Südhof 1999). Regulation of the number of transmitter molecules per vesicle (the quantal size) and of the release process is an essential aspect of neurotransmission.

Catecholamines (adrenaline and noradrenaline) are synthesized in adrenal chromaffin cells and then stored within secretory granules, where they reach high concentrations (about 0.5 M) (Phillips 1982) as a result of the activity of the vacuolar ATPase, which drives protons into granules, and of vesicular monoamine transporters (VMAT1 and VMAT2), which catalyse the exchange of protons for monoamines (Schuldiner *et al.* 1995; Liu and Edwards 1997; Henry *et al.* 1998). At steady state, intravesicular monoamine concentration should depend only on the electrochemical proton gradient ($\Delta\mu\text{H}^+$). However, there is evidence that quantal size is not merely determined by thermodynamic equilibrium. Inactivation of the VMAT2 gene (Fon *et al.* 1997; Takahashi

et al. 1997; Wang *et al.* 1997a) and overexpression of VMAT2 (Pothos *et al.* 2000) in PC12 cells induced a reduction or an augmentation of the quantal size, respectively. These observations indicate that intravesicular monoamine concentration depends not only on $\Delta\mu\text{H}^+$ but also on the kinetics of vesicular monoamine transport (Henry *et al.* 1998; Sulzer and Pothos 2000). In neurones, transporters located on the plasma membrane also have an essential role in the regulation of the quantal size by supplying transmitters (Sulzer and Pothos 2000).

Received July 23, 2002; revised manuscript received October 23, 2002; accepted October 26, 2002.

Address correspondence and reprint requests to François Darchen, CNRS UPR 1929, Institut de Biologie Physico-Chimique, 13 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France. E-mail: Francois.Darchen@ibpc.fr

Abbreviations used: BSA, bovine serum albumin; DA, dopamine; DAT, dopamine transporter; DMRIE-C, 1,2-dimyristyloxypropyl-3 dimethylhydroxyethyl ammonium bromide-cholesterol; EGFP, enhanced green fluorescent protein; GFP, green fluorescent protein; GTP, guanosine 5'-triphosphate; hGH, human growth hormone; 5-HT, 5-hydroxytryptamine; MAO, monoamine; SERT, serotonin transporter; SLO, streptolysin-O; VMAT, vesicular monoamine transporter.

Compared with secretory granules of primary cultured chromaffin cells, vesicles found in PC12 cells contain very little catecholamines. Moreover, the cellular uptake of exogenous monoamines is very low. These peculiarities are detrimental to secretion studies. Here, we exploited this situation to investigate the effect of transient expression of plasma membrane monoamine transporters on vesicular monoamine concentration and observed large increases in quantal size. Furthermore, we demonstrated that the secretory activity of the subpopulation of transfected cells expressing a plasma membrane monoamine transporter is easily measured, since the vast majority of stored and releasable monoamines originate from these cells. Consequently, the effect of any given co-expressed protein on the secretory process can be determined.

Experimental procedures

Materials

Plasmids encoding rat serotonin transporter (SERT) (pcDNA3-rSERT) and botulinum toxin C1 (pcDNA3-BoNT/C1) were kindly provided by Drs R. Blakely (Nashville, TN, USA) and R. D. Burgoyne (Liverpool, UK), respectively. Plasmids encoding rat or human dopamine transporter (DAT) and human norepinephrine transporter (NET) were obtained from B. Giros (Paris, France). Vectors encoding Rabphilin-RBD and Rim were gifts from Drs R. W. Holz (Ann Arbor, MI, USA) and T. C. Südhof (Dallas, TX, USA), respectively. pEGFP-C1 was from BD Biosciences Clontech (Palo Alto, CA, USA).

Vectors encoding wild-type and mutant forms of huRab3a were described previously (Johannes *et al.* 1994). Plasmids encoding both rSERT and huRab3a (wild-type or mutants) were constructed as follows. The coding region of rSERT was amplified by PCR using the primers 5'-CTCCCGGGTTTAACTTACACAGCATTTCAT-3' and 5'-GTAGGCGCGCAAGCATGGAGACCAC-3', and subcloned into a modified pcDNA3 vector with PmeI/AscI cloning sites flanking the neomycin gene (a gift from R. Regazzi, Lausanne, Switzerland). Mutant or wild-type forms of huRab3a were cloned, using *HindIII/EcoRI* sites, into the polylinker region of the modified vector.

Streptolysin-O (SLO) was obtained from Pr S. Bhakdi (Mainz, Germany) (Bhakdi *et al.* 1993). Other chemicals were purchased from Sigma (Cambridge, UK).

Cell culture and transfection

PC12 cells (obtained from G. Ahnert-Hilger, Berlin, Germany) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (1 g/L glucose) supplemented with fetal calf and horse sera (7.5% each) and gentamicin (25 µg/mL) in collagen-coated flasks at 37°C with 5% CO₂. Confluent cells were harvested the day before transfection, dissociated by trypsin treatment and plated at 2 × 10⁵ cells/cm² in collagen-coated 24-well plates for [³H]5-HT secretion experiments, or at 5 × 10⁴ cells/cm² in poly-L-lysine-coated coverslips for amperometry recordings. After 12–24 h, cells were transiently transfected with 1,2-dimyristyloxypropyl-3 dimethylhydroxyethyl ammonium bromide-cholesterol (DMRIE-C) (Invitrogen, Gronin-

gen, the Netherlands) following the supplier's instructions with slight modifications: 0.8 µg total DNA and 1.25 µL DMRIE-C were added to each well in 300 µL serum-free medium. Five hours later, the medium was replaced by fresh complete culture medium. Experiments were performed 3 days after transfection except where indicated. This transfection procedure did not interfere with the secretory activity of PC12 cells.

Amperometry

Preparation of electrodes

Carbon-fibre microelectrodes were pulled from borosilicate glass capillaries (GC120F-10, Clark Electromedical, Pangbourne, UK) containing a 10-µm diameter carbon fibre (Thornell, type P-55S, Amoco, Greenville, SC, USA) using a horizontal capillary puller (Sachs-flaming PC-84, Sutter Instruments, Novato, CA, USA). The capillary was back-filled with mercury and the carbon tip was isolated by electrodeposition (4 V, 4 min) of polyoxyphenylene. The mercury was removed and the polymer was reticulated (150°C, 3 h). The very tip of the electrode was cut using a scalpel blade and polished at an angle near 45° on a micropipette beveler (EG-40, Narishige, Tokyo, Japan). Electrodes were visually examined under the microscope and response stability was tested in fresh 50 µM DA solution.

Experimental set-up

Amperometric detection was carried out using an AMU-130 potentiostat (Radiometer Analytical, Copenhagen, Denmark) at 750 mV versus reference electrode (Ag/AgCl). The analogic output was digitalized at 1 kHz (Computer Boards, DAS 1000) and acquired using Elphy software (G. Sadoc, Gif sur Yvette, France). Traces were analysed with MiniAnalysis (Synaptosoft, Decatur, GA, USA) and Elphy. All experiments were performed on the stage of an inverted microscope (Diaphot TMD, Nikon, Tokyo, Japan) at room temperature (22–25°C). PC12 cells were loaded with 1 mM dopamine for 1 h, or with 10–1000 µM 5-HT for 1 h, at 37°C in culture medium in the presence of 100 µM pargylin. Just before recording, cells were transferred in Locke's solution containing (in mM) NaCl 154, KCl 5.5, glucose 5.6, NaHCO₃ 3.5, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.2, HEPES 15, pH 7.4 adjusted with NaOH. Osmolarity was checked to be near 340 mosm. The working electrode was positioned near (< 1 µm) a single isolated PC12 cell using a micropositioner (MO-203, Narishige, Tokyo, Japan). The tip (diameter < 1 µm) of a micropipette containing depolarizing solution (Locke's solution with 110 mM K⁺) was positioned at approximately 20 µm from the target cell with a motorized micropositioner (5171, Eppendorf, Hamburg, Germany). Stimulating solution was pressure-ejected with a microinjector (5246, Eppendorf), with fast green added as a visual aid for orienting flux. To eliminate bias due to electrode gum up, the electrode response was verified after recording 5–6 cells in fresh 50 µM DA and then briefly polished if necessary. Transfected and non-transfected cells were alternately recorded to reduce electrode state bias.

[³H]5-HT uptake and secretion

On the day of the experiment, the culture medium was replaced by 600 µL of complete medium containing 100 nM tritiated 5-HT (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, UK, 5–20 Ci/mmol). After 1 h at 37°C, the cells were washed with 0.5 mL Locke's

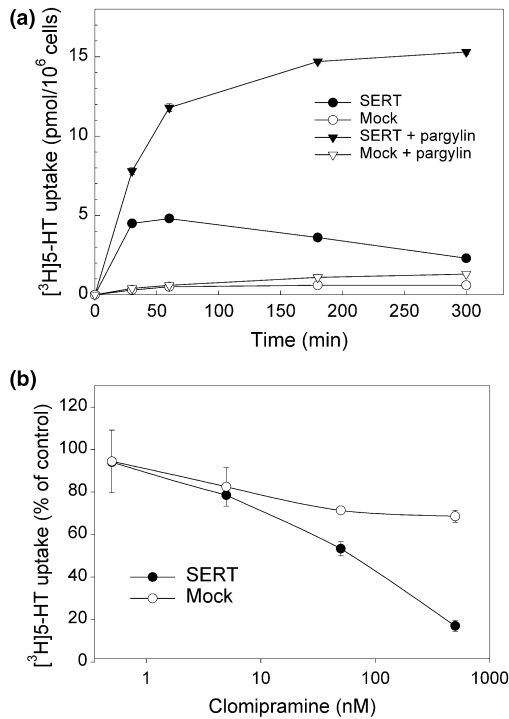


Fig. 1 (a) Time course of [³H]5-HT accumulation into PC12 cells. Mock- and SERT- transfected cells were incubated for various times (15 min to 5 h) at 37°C with 100 nM [³H]5-HT in the presence or the absence of 100 μM pargylin. After washing, the radioactivity accumulated within cells was counted. In the majority of experiments, the uptake of [³H]5-HT was magnified 15 to 30-fold in SERT-expressing cells compared with control cells. Data are presented as the mean ± SD of three independent measurements. Error bars smaller than symbols were omitted. (b) Effect of clomipramine on 5-HT uptake. The uptake of [³H]5-HT was determined as in (a) after a 1-h uptake in the presence of increasing concentrations of clomipramine. In SERT-expressing cells, clomipramine inhibited [³H]5-HT uptake with an IC₅₀ of 50 nM.

solution plus 0.2% BSA, kept at 37°C for 1.5 h in complete medium and washed twice for 10 min with Locke's solution plus 0.2% BSA. Where indicated (Fig. 1a), pargylin 100 μM was added during [³H]5-HT uptake and washes. Secretion was performed at 32–34°C, in 0.5 mL modified Locke's solution (55 mM K⁺ with Na⁺ reduced to 104.5 mM). Unstimulated conditions were made with 0.5 mL standard Locke's solution (5.5 mM K⁺/154 mM Na⁺). After 2–10 min of incubation, the medium was collected, the cells were recovered in 0.5 mL Triton X100 1% plus 1 mM EDTA and the radioactivity was determined by scintillation counting.

Alternatively, cells were rinsed twice with Ca²⁺-free Locke's solution and permeabilized for 4 min at 32–34°C with 20 μM digitonin or 22 U SLO in (in mM) potassium glutamate 139, 1,4-piperazine diethane sulfonic acid (PIPES) 20, N-(2-hydroxyethyl)ethylenediaminetriacetic acid (HEDTA) 2, EGTA 2, free Mg²⁺ 1, ATP 2, plus 0.3% BSA and pH adjusted to 7 using KOH. Secretion was then elicited in the same medium, supplemented with 30 μM free Ca²⁺, for 5 min at 32–34°C. Free Ca²⁺ concentrations were calculated according to Föhr *et al.* (1993) using calcv.22 software (Dr. M. Gratzl, Munich, Germany).

Statistical analyses

Significance of differences was calculated using the unpaired Student's *t*-test; **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001.

Results

Effect of serotonin transporter expression on the loading of secretory vesicles

Under our standard culture conditions, rat pheochromocytoma PC12 cells are almost completely devoid of endogenous catecholamines. Moreover, their monoamine uptake activity is very low (4.0 ± 0.3 fmol/min/10⁶ cells; mean ± SEM, *n* = 11 independent experiments; Fig. 1a). The effect of overexpression of the rat plasma SERT on the uptake of [³H]5-hydroxytryptamine ([³H]5-HT) was measured. The uptake activity was increased approximately 20-fold (23 ± 3; mean ± SEM, from 42 independent experiments) 3 days after transfection, compared with control PC12 cells (Fig. 1a). Similar effects were observed with DAT and NET that increase [³H]dopamine uptake more than 10-fold (see below). Under the conditions used in this study, 10–20% of the cells were readily transfected, as estimated by GFP expression (not shown). Thus, overexpression of SERT induced at least a 100-fold increase in serotonin uptake in individual transfected cells. Clomipramine, a specific inhibitor of SERT, blocked this increase in 5-HT uptake with an IC₅₀ of 50 nM (Fig. 1b), a value which is consistent with the known affinity of this drug for SERT (Hoffman *et al.* 1991). In non-transfected cells, clomipramine had a limited effect on serotonin uptake. Accordingly, SERT was not detected in control PC12 cells by immunocytochemistry, whereas an intense labelling of the cell surface was observed in SERT-transfected cells (not shown).

In SERT-transfected cells, the uptake of [³H]5-HT reached a maximum after 1 h and then diminished as a function of time (Fig. 1a). In contrast, in the presence of 100 μM pargylin, an inhibitor of monoamine oxidase (MAO), intracellular [³H]5-HT steadily increased for at least 5 h. These observations suggested that serotonin is rapidly metabolized by the mitochondrial MAO unless it is stored in secretory vesicles, and that vesicular and cytosolic monoamines are in dynamic equilibrium. When measured after removal of external [³H]5-HT and addition of clomipramine to prevent serotonin re-uptake, the cellular levels of [³H]5-HT decayed exponentially (Fig. 2a). The decay was more pronounced in the presence of reserpine, a highly specific inhibitor of the vesicular monoamine transporters (VMAT). In contrast, it was reduced in the presence of pargylin (Fig. 2a). Moreover, addition of reserpine from the beginning of serotonin uptake completely prevented the accumulation of [³H]5-HT in the population of SERT-transfected cells (97% inhibition at 0.1 μM reserpine, Fig. 2b). These results further demonstrate the existence of an efflux of serotonin out of secretory vesicles.

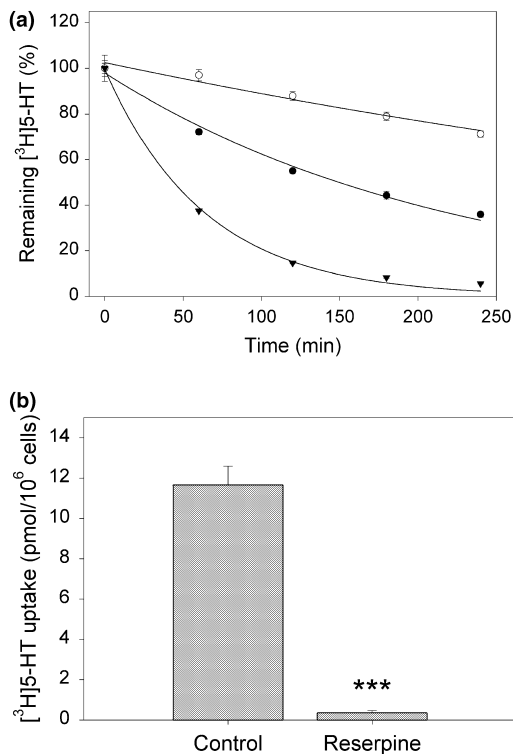


Fig. 2 (a) Efflux of [³H]5-HT from secretory vesicles. SERT-transfected cells were incubated for 30 min with [³H]5-HT, washed, and incubated for the indicated period of time in the presence of clomipramine (●), clomipramine and reserpine (▼) or clomipramine and pargylin (○). The radioactivity accumulated within cells was then counted and expressed as percentage of cellular [³H]5-HT (mean ± SD, *n* = 3) at *t* = 0. Similar results were obtained in three independent experiments. (b) Inhibition of [³H]5-HT accumulation by reserpine. SERT-transfected cells were incubated for 1 h with [³H]5-HT in the presence or the absence of 0.1 μM reserpine, a specific inhibitor of vesicular monoamine transporters. Shown is the radioactivity retained by the cells after washing (mean ± SD, *n* = 3); ****p* < 0.001.

PC12 cells were then incubated with increasing amounts of serotonin, washed, and challenged with high-K⁺ saline in order to evoke exocytosis of secretory vesicles. The secretory responses were monitored at the single cell level by means of carbon fibre amperometry. Exocytosis is resolved by this technique as a series of current spikes, each spike being produced by the oxidation of the content of a single vesicle (Wightman *et al.* 1991). After a 1-h incubation with 10 μM serotonin, secretory events were almost undetectable in control cells, whereas many amperometric spikes were observed in cells expressing SERT and GFP (the latter being used to identify transfected cells) (Fig. 3a). This result demonstrated directly that the vesicular concentration of serotonin was augmented as a result of SERT overexpression. In non-transfected cells, increasing the concentration of 5-HT during the loading period from 10 μM to 1 mM induced a marked increase in spike frequency. In contrast, a similar

distribution of spike amplitude was observed in SERT-transfected cells loaded with 10, 100 or 1000 μM 5-HT (Fig. 3b). These results are in agreement with the *K_m* of SERT-mediated transport of 5-HT, and with the approximately 100-fold increase in uptake of [³H]5-HT measured on populations of SERT-transfected cells, compared with control cells.

Study of secretory machinery on cells overexpressing monoamine transporters

Two to four days after transfection with vectors encoding SERT, DAT or NET, PC12 cells were loaded with either [³H]5-HT or [³H]DA. As illustrated in Fig. 4(a), overexpression of DAT or NET led to an approximate 10-fold enhancement of [³H]DA uptake, whereas SERT induced moderate enhancement of dopamine uptake. Conversely, [³H]5-HT uptake was greatly increased upon SERT overexpression but was insensitive to DAT or NET expression. Next, transfected cells were loaded with labelled monoamines and stimulated to secrete by elevated K⁺ or 2 mM Ba²⁺. The amounts of [³H]5-HT released upon stimulation were greatly increased in SERT-transfected cells (Fig. 4b). The contribution of non-transfected cells (which represent 80–90% of the cell population in each well) to the total counts was less than 5%. Therefore, measurement of [³H]5-HT release provides accurate determination of the secretory activity of the subpopulation of transfected cells.

The fractional release of serotonin (released vs. total [³H]5-HT) from cells overexpressing SERT was reproducibly lower (typically ~50%) than that of non-transfected cells (Fig. 5, Ba²⁺ and K⁺). This effect was in fact due to SERT-mediated uptake of released [³H]5-HT and was suppressed by addition of clomipramine during the stimulation period (Fig. 5). Nevertheless, additional experiments were performed in order to ascertain that the secretory activity of PC12 cells was not affected by transient expression of monoamine transporters. The addition of 30 μM free Ca²⁺ to digitonin- or streptolysin O-permeabilized cells triggered similar secretory responses in SERT-transfected and non-transfected cells (Fig. 5). Moreover, secretory responses were measured by carbon fibre amperometry after a 1 h incubation in the presence of 1 mM dopamine in order to load both transfected and non-transfected cells. The frequency of amperometric spikes was similar in SERT-transfected cells (0.46 ± 0.07 Hz; mean ± SEM, *n* = 12) and in non-transfected cells (0.37 ± 0.13 Hz; mean ± SEM, *n* = 12). Therefore, it can be concluded that transient overexpression of monoamine transporters does not affect the secretory machinery but provides a means of measuring the secretory activity of the subpopulation of transfected cells. It is worth noting that the measurement of secretory activity was independent of the concentration of [³H]5-HT (10 nM–10 μM) used to load the cells, and of the amount of SERT DNA added during the transfection procedure (0.2–1.6 μg/well).

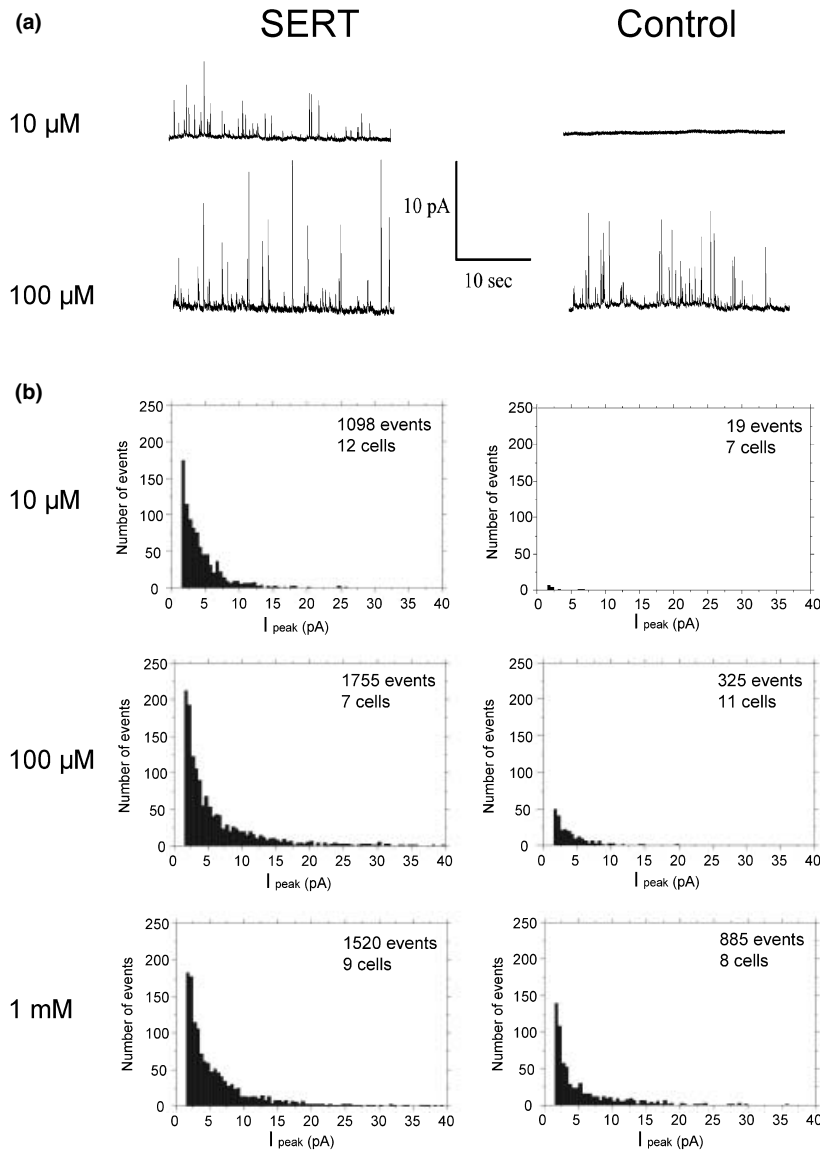


Fig. 3 Analysis of amperometric spikes from control and SERT-transfected PC12 cells. Cells were incubated for 1 h with 10, 100 or 1000 μM 5-HT as indicated, washed, and stimulated with a 55 mM K^+ solution. Secretory responses were monitored by carbon-fibre amperometry. (a) Examples of amperometric recordings in non-transfected (control) and SERT-transfected (SERT) cells loaded with the indicated 5-HT concentration. Representative traces are shown. At 10 μM 5-HT, very few exocytotic events were detectable in control

cells, whereas many spikes were observed in SERT-expressing cells. Increasing 5-HT concentration induced little modification of the traces recorded from SERT-transfected cells but a large increase in the frequency of spikes detected in control cells. (b) Distribution of the amplitude of spikes recorded from control cells or from SERT-transfected cells loaded with the indicated 5-HT concentration. The number of events is plotted as a function of the peak current (I_{peak}).

These results suggested that monoamine transporter over-expression might prove useful in a co-transfection strategy aimed at evaluating the effect of various proteins on the secretory process. To test this possibility, PC12 cells were co-transfected with a vector encoding rat SERT and plasmids encoding proteins with known effects on exocytosis. As reported previously (Fisher and Burgoyne 1999), the probability that cells transfected with one plasmid are also

transfected with a second is very high. Under the conditions used in this study, > 95% of PC12 cells expressing Discosoma Red fluorescent protein (DsRed) also expressed GFP (not shown)

Three days after transfection, the cells were loaded with [^3H]5-HT and stimulated to secrete. As expected, the light chain of botulinum neurotoxin C1 that cleaves syntaxin (Schiavo *et al.* 2000), an important component of the fusion

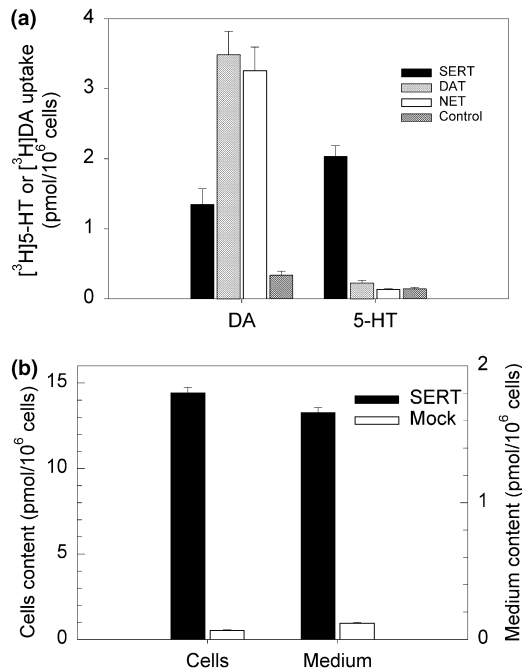


Fig. 4 Expression of monoamine transporters allows accurate measurement of secretion from transfected cells. (a) Uptake of [³H]DA (left panel) and [³H]5-HT (right panel) for 1 h at 37°C in PC12 cells transfected with SERT, DAT or NET, or in mock-transfected cells. (b) PC12 cells were transfected with pcDNA3 (mock) or pcDNA3-SERT (SERT), loaded with [³H]5-HT for 1 h, washed and stimulated for 10 min at 37°C by high K⁺ saline. The radioactivity contained in the cells (left axis) and in the medium (right axis) was measured and shown as the mean ± SD of three independent measurements. Basal release measured in the absence of stimulus (control: 0.021 ± 0.002 pmol/10⁶ cells; SERT-transfected cells: 0.50 ± 0.04) was subtracted.

machinery, inhibited the secretory response (Fig. 6). Rab3 is a guanosine 5'-triphosphate (GTP)-binding protein associated with secretory vesicles, which was shown to control the release process (Darchen and Goud 2000). In agreement with previous observations, overexpression of GTPase-deficient Rab3aQ81L inhibited secretory responses (Fig. 6). Similar results were obtained upon transfection of cells with a mixture of plasmids encoding SERT and Rab3aQ81L, or with a single plasmid encoding both proteins (Fig. 6). This latter observation further demonstrates the efficiency of co-transfection. Overexpression of wild-type Rab3a, Rab3bQ81L or the Rab3-binding domain of Rabphilin also inhibited secretory responses (Fig. 6), as previously reported (Holz *et al.* 1994; Johannes *et al.* 1994; Chung *et al.* 1995; Iezzi *et al.* 1999). In contrast, the secretory activity of cells overexpressing either Rab3aQ81L-V55E (carrying a second mutation in the 'effector loop') or EGFP (not shown), was not significantly different from that of cells transfected with the vector encoding SERT only. This observation is consistent with previous results showing the lack of inhibitory effect of

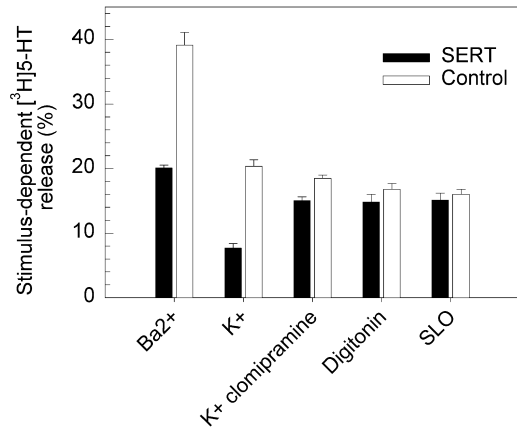


Fig. 5 The secretory activity of PC12 cells is not affected by SERT overexpression. Non-transfected (open bars) or SERT-transfected PC12 cells (black bars) were loaded with [³H]5-HT and stimulated for 10 min either by high K⁺ or 2 mM Ba²⁺, or permeabilized by digitonin or streptolysin-O (SLO) in the presence of 30 μM free Ca²⁺. Where indicated, 1 μM clomipramine was added during the stimulation period. Data are expressed as percentage (mean ± SEM of three independent experiments) of total radioactivity present in the cells prior to stimulation. Basal release, measured in the absence of stimulus, was subtracted. The basal release of SERT-transfected cells was not significantly different from that of control cells (non-permeabilized cells: 3.3 ± 1.4%; mean ± SEM, *n* = 22; permeabilized cells: 6.5 ± 2.2%; mean ± SEM, *n* = 23).

Rab3Q80 L-V55E in *Aplysia* neurones (Johannes *et al.* 1996). Finally, overexpression of full length Rim, a Rab3 interacting partner localized to the presynaptic active zone (Wang *et al.* 1997b), enhanced [³H]5-HT release (Fig. 6), as reported previously, by means of another co-transfection assay (Sun *et al.* 2001).

Discussion

Control of quantal size by monoamine transporters

In this study, we found that the uptake of serotonin was increased approximately 20-fold in the population of SERT-transfected PC12 cells (and thus, > 100-fold in individual transfected cells). Moreover, the intravesicular concentration of monoamines was greatly increased, as demonstrated by carbon-fibre amperometry of released monoamines. This also indicates that the uptake activity of monoamine transporters can be determined, at the single cell level, by measuring the size of amperometric spikes. However, once transported, serotonin did not remain securely entrapped within secretory vesicles. Indeed, cellular amounts of [³H]5-HT decayed exponentially with a time constant of about 1 h (measured in the presence of reserpine, Fig. 2a). This observation demonstrates that monoamines leak from secretory vesicles. In agreement with this result, inhibition of VMAT by reserpine reduced quantal size in PC12 cells

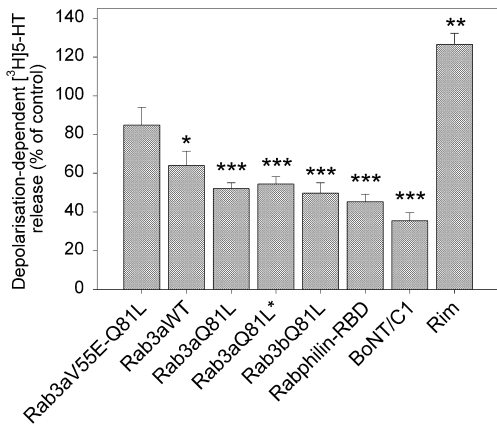


Fig. 6 Effect of various proteins on secretion determined by the SERT co-transfection assay. An expression vector encoding SERT was co-transfected into PC12 cells with an empty expression vector (control) or with vectors encoding wild-type Rab3a (Rab3aWT), GTPase-deficient Rab3aQ81L (Rab3aQ81L) and Rab3bQ81L (Rab3bQ81L), Rab3aV55E-Q81L which carries an extra mutation in the effector loop (Rab3aV55E-Q81L), botulinum clostridial neurotoxin C1 light chain (BoNT/C1), the Rab binding domain of Raphilin3a (Rabphilin-RBD) or full length Rim (Rim). Alternatively, cells were transfected with a single vector encoding both SERT and Rab3aQ81L (Rab3aQ81L*). Three days after transfection, PC12 cells were loaded with [³H]5-HT and stimulated for 10 min with 55 mM K⁺ solution. Data are expressed as percentage (mean ± SEM of three experimental determinations) of the depolarization-dependent [³H]5-HT release measured in control cells. Basal release (1.88 ± 0.2%, mean ± SEM, *n* = 12) measured in normal saline solution was subtracted. The various constructs tested did not induce significant change of basal release. Similar results were obtained in at least three independent experiments; **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

(Kozminski *et al.* 1998). Due to this efflux process, intravesicular monoamine concentration probably does not reach thermodynamic equilibrium and is sensitive to changes in vesicular transporter activity (Fon *et al.* 1997; Wang *et al.* 1997a; Travis *et al.* 2000). In the case of clear synaptic vesicles, the rate of monoamine efflux is probably much higher, due to the lack of intravesicular polyanionic matrix able to interact with protonated monoamines (Westermann *et al.* 1988) and to the higher surface/volume ratio of small vesicles, compared with dense core granules (Henry *et al.* 1998).

The effect of MAO inhibition on cellular [³H]5-HT levels and the near complete absence of [³H]5-HT in reserpine-treated cells indicates that cytosolic monoamine concentration is highly dependent on MAO activity. Consequently, these results indicate that MAO may regulate quantal size by displacing the equilibrium towards lower values. Since vesicular transporters simply convert the $\Delta\mu\text{H}^+$ into a monoamine gradient across the vesicle membrane, reducing cytosolic monoamine concentration will affect steady state vesicular concentration. Consistently, MAO inhibitors

increase both basal and depolarization-induced release of dopamine from rat striatum (Harsing and Vizi 1984). Moreover, mice lacking MAO-A display increased aggressive behaviour that is likely to be a consequence of an increased quantal size, since it is alleviated by tetrabenazine, a VMAT inhibitor (Shih *et al.* 1999).

Intravesicular neurotransmitter concentration is thus a complex function of the cytosolic transmitter concentration, which is controlled by MAO and plasma membrane transporters, of the driving force ($\Delta\mu\text{H}^+$ and vesicular transporter action) and outward flux of transmitters.

A new co-transfection assay for investigating the role of proteins in exocytosis

As a consequence of the increased rate of serotonin uptake in transfected cells compared with non-transfected cells, and of the rapid accumulation within secretory vesicles, most of the serotonin released on stimulation originates from transfected cells (> 95%). This was also demonstrated directly by carbon-fibre amperometry. When low concentrations of serotonin (approximately 10 μM , i.e. near the *K_m* of SERT-mediated transport) were used to load the cells, spikes were detected only in transfected cells. Therefore, we conclude that SERT transfection allows specific measurement of the secretory activity of transfected cells. Consequently, the effect of a protein encoded by a second plasmid on the secretory process can be detected, given the high probability of co-transfection. As illustrated in Fig. 6, the previously described effect of botulinum toxin C1, GTPase-deficient Rab3 proteins, the N-terminal domain of Rabphilin and Rim (Blasi *et al.* 1993; Holz *et al.* 1994; Johannes *et al.* 1994; Chung *et al.* 1995; Fisher and Burgoyne 1999; Iezzi *et al.* 1999; Graham *et al.* 2000; Sun *et al.* 2001) could be demonstrated by this approach. Given the high serotonin uptake activity of transfected cells, a significant part of the [³H]5-HT released upon stimulation is taken up by SERT. Therefore, secretion should be measured in the presence of clomipramine. It is also worth noting that addition of pargylin during monoamine uptake may be useful for increasing 5-HT stores.

Different techniques have been developed to determine the effect of a given protein on the secretory process. Most of them are very demanding and time consuming, such as gene knock out. It is possible to measure exocytosis with high precision at the single cell level by means of electrophysiological recordings of post-synaptic currents, membrane capacitance measurements or carbon-fibre amperometry. However, the combination of acute modification of the cells by micro-injection, transfection or viral transduction, and single cell assay of exocytosis, is also somewhat difficult to achieve. Therefore, there is a need for methods which allow rapid determination of the effect of a given protein on the secretory process at the cell population level. Transient transfection of adrenal chromaffin cells or pheochromocytoma PC12 cells by

plasmids encoding human growth hormone (hGH) was developed to fulfil this requirement (Wick *et al.* 1993). Since hGH is properly targeted to secretory vesicles and released in response to Ca²⁺ elevation, the secretory activity of the subpopulation of transfected cells can be determined by measuring hGH release.

The method described in this study has a number of advantages. The reporter activity (uptake and release of monoamines) is a physiological activity of these cells. It is not sensitive to small modifications of SERT levels. This might be important because co-expression of a protein of interest may interfere with SERT expression. A wide range of [³H]5-HT concentrations can be used to load the cells without interfering with the test. Indeed, compared with other assays, [³H]5-HT measurement is sensitive and highly accurate. Moreover, measurements are rapid and inexpensive. Finally, this approach allows measurement of secretory activity either at the population level or at the single cell level by means of carbon-fibre amperometry.

Acknowledgements

We thank F. Gonon for his initial help in carbon-fibre amperometry measurements, G. Sadoc for the Elphy software, S. Arbault for his help in the preparation of carbon-fibre electrodes and C. Chapuis for her skilful technical assistance.

References

- Bhakdi S., Weller U., Walev I., Martin E., Jonas D. and Palmer M. (1993) A guide to the use of pore-forming toxins for controlled permeabilization of cell membranes. *Med. Microbiol. Immunol.* **182**, 167–175.
- Blasi J., Chapman E. R., Yamasaki S., Binz T., Niemann H. and Jahn R. (1993) Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *EMBO J.* **12**, 4821–4828.
- Chung S. H., Takai Y. and Holz R. W. (1995) Evidence that the Rab3a-binding protein, rabphilin3a, enhances regulated secretion. Studies in adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 16714–16718.
- Darchen F. and Goud B. (2000) Multiple aspects of Rab protein action in the secretory pathway: focus on Rab3 and Rab6. *Biochimie* **82**, 375–384.
- Fisher R. J. and Burgoyne R. D. (1999) The effect of transfection with Botulinum neurotoxin C1 light chain on exocytosis measured in cell populations and by single-cell amperometry in PC12 cells. *Pflugers Arch.* **437**, 754–762.
- Föhr K. J., Warchol W. and Gratzl M. (1993) Calculation and control of free divalent cations in solutions used for membrane fusion studies. *Meth. Enzymol.* **221**, 149–157.
- Fon E. A., Pothos E. N., Sun B. C., Killeen N., Sulzer D. and Edwards R. H. (1997) Vesicular transport regulates monoamine storage and release but is not essential for amphetamine action. *Neuron* **19**, 1271–1283.
- Graham M. E., Fisher R. J. and Burgoyne R. D. (2000) Measurement of exocytosis by amperometry in adrenal chromaffin cells: effects of clostridial neurotoxins and activation of protein kinase C on fusion pore kinetics. *Biochimie* **82**, 469–479.
- Harsing L. G. Jr and Vizi E. S. (1984) Release of endogenous dopamine from rat isolated striatum: effect of clorgyline and (-)-deprenyl. *Br. J. Pharmacol.* **83**, 741–749.
- Henry J. P., Sagne C., Bedet C. and Gasnier B. (1998) The vesicular monoamine transporter: from chromaffin granule to brain. *Neurochem. Int.* **32**, 227–246.
- Hoffman B. J., Mezey E. and Brownstein M. J. (1991) Cloning of a serotonin transporter affected by antidepressants. *Science* **254**, 579–580.
- Holz R. W., Brondyk W. H., Senter R. A., Kuizon L. and Macara I. G. (1994) Evidence for the involvement of Rab3A in Ca²⁺-dependent exocytosis from adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 10229–10234.
- Iezzi M., Escher G., Meda P., Charollais A., Baldini G., Darchen F., Wollheim C. B. and Regazzi R. (1999) Subcellular distribution and function of Rab3A, B, C, and D isoforms in insulin-secreting cells. *Mol. Endocrinol.* **13**, 202–212.
- Jahn R. and Südhof T. C. (1999) Membrane fusion and exocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 863–911.
- Johannes L., Lledo P. M., Roa M., Vincent J. D., Henry J. P. and Darchen F. (1994) The GTPase Rab3a negatively controls calcium-dependent exocytosis in neuroendocrine cells. *EMBO J.* **13**, 2029–2037.
- Johannes L., Doussau F., Clabecq A., Henry J. P., Darchen F. and Poulain B. (1996) Evidence for a functional link between Rab3 and the SNARE complex. *J. Cell Sci.* **109**, 2875–2884.
- Kozminski K. D., Gutman D. A., Davila V., Sulzer D. and Ewing A. G. (1998) Voltammetric and pharmacological characterization of dopamine release from single exocytotic events at rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Anal. Chem.* **70**, 3123–3130.
- Liu Y. and Edwards R. H. (1997) The role of vesicular transport proteins in synaptic transmission and neural degeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* **20**, 125–156.
- Phillips J. H. (1982) Dynamic aspects of chromaffin granule structure. *Neuroscience* **7**, 1595–1609.
- Pothos E. N., Larsen K. E., Krantz D. E., Liu Y., Haycock J. W., Setlik W., Gershon M. D., Edwards R. H. and Sulzer D. (2000) Synaptic vesicle transporter expression regulates vesicle phenotype and quantal size. *J. Neurosci.* **20**, 7297–7306.
- Schiavo G., Matteoli M. and Montecucco C. (2000) Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol. Rev.* **80**, 717–766.
- Schuldiner S., Shirvan A. and Linial M. (1995) Vesicular neurotransmitter transporters: from bacteria to humans. *Physiol. Rev.* **75**, 369–392.
- Shih J. C., Ridd M. J., Chen K., Meehan W. P., Kung M. P., Seif I. and De Maeyer E. (1999) Ketanserin and tetrabenazine abolish aggression in mice lacking monoamine oxidase A. *Brain Res.* **835**, 104–112.
- Sulzer D. and Pothos E. N. (2000) Regulation of quantal size by presynaptic mechanisms. *Rev. Neurosci.* **11**, 159–212.
- Sun L., Bittner M. A. and Holz R. W. (2001) Rab3a binding and secretion-enhancing domains in Rim1 are separate and unique. Studies in adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 12911–12917.
- Takahashi N., Miner L. L., Sora I., Ujike H., Revay R. S., Kostic V., Jackson-Lewis V., Przedborski S. and Uhl G. R. (1997) VMAT2 knockout mice: heterozygotes display reduced amphetamine-conditioned reward, enhanced amphetamine locomotion, and enhanced MPTP toxicity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 9938–9943.
- Travis E. R., Wang Y. M., Michael D. J., Caron M. G. and Wightman R. M. (2000) Differential quantal release of histamine and 5-hydroxytryptamine from mast cells of vesicular monoamine transporter 2 knockout mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 162–167.

- Wang Y. M., Gainetdinov R. R., Fumagalli F., Xu F., Jones S. R., Bock C. B., Miller G. W., Wightman R. M. and Caron M. G. (1997a) Knockout of the vesicular monoamine transporter 2 gene results in neonatal death and supersensitivity to cocaine and amphetamine. *Neuron* **19**, 1285–1296.
- Wang Y., Okamoto M., Schmitz F., Hofmann K. and Südhof T. C. (1997b) Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature* **388**, 593–598.
- Westermann R., Stogbauer F., Unsicker K. and Lietzke R. (1988) Calcium-dependence of chromogranin A–catecholamine interaction. *FEBS Lett.* **239**, 203–206.
- Wick P. F., Senter R. A., Parsels L. A., Uhler M. D. and Holz R. W. (1993) Transient transfection studies of secretion in bovine chromaffin cells and PC12 cells. Generation of kainate-sensitive chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 10983–10989.
- Wightman R. M., Jankowski J. A., Kennedy R. T., Kawagoe K. T., Schroeder T. J., Leszczyszyn D. J., Near J. A., Diliberto E. J. Jr and Viveros O. H. (1991) Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **88**, 10754–10758.

Chapitre III

Les protéines Rab

III. Les protéines Rab

Le groupe des protéines Rab représente une branche importante au sein des petites GTPases de la superfamille de Ras. Le terme de protéine G vient de la capacité de ces molécules à lier les nucléotides guanyliques, GDP ou GTP.

On distingue généralement 2 types de protéines G :

- Les protéines G hétérotrimériques, constituées de l'association de 3 sous-unités ; la sous-unité G_α est la composante catalytique, capable d'hydrolyser le GTP en GDP, tandis que les sous-unités G_β et G_γ sont des sous-unités régulatrices. Ces protéines G sont fréquemment impliquées dans la transduction du signal en aval de récepteurs à 7 segments transmembranaires.
- Le groupe des protéines G monomériques (encore appelées "petites protéines G" constitue la famille à laquelle appartiennent les Rab, et qui nous intéresse donc plus particulièrement.

On peut, au sein même de la famille des protéines G monomériques, distinguer encore 2 branches :

- Les protéines G monomériques de la famille de EF-Tu (comme eIF2 ou SRP) sont impliquées dans la synthèse protéique. EF-Tu a notamment été la première protéine G monomérique étudiée en détail.
- Les protéines G de la superfamille de Ras (dont les Rab), qui sont impliquées dans une multitude de processus cellulaires, allant du transport intracellulaire à la dynamique du cytosquelette, en passant par le contrôle de la prolifération et la différenciation cellulaire.

III.A. La superfamille Ras

On compte dans la superfamille de Ras cinq sous-familles, basées sur le degré d'identité de leur séquence primaire. On distingue ainsi les sous-familles Ras (ex: Ras, Rap, Ral ; cascades de transduction du signal), Rho (ex: Rho, Rac, Cdc42 ; très impliquée dans la régulation de l'organisation du cytosquelette), ARF (ADP ribosylation factors ; transport intracellulaire, régulation de l'assemblage des manteaux vésiculaires), Ran (trafic nucléaire) et enfin la branche Rab/Ypt.

De fait, cette classification recouvre aussi une certaine fonctionnalité, les protéines d'une même sous-famille ayant souvent des fonctions apparentées ; on notera cependant que ces fonctions s'interpénètrent, et qu'il existe des "dialogues" croisés entre ces groupes.

Au sein de chaque sous-famille, on distingue encore les différentes isoformes d'une Rab donnée (ex Rab3a, b, c et d) sur la base de la séquence primaire, avec la même remarque que précédemment. Ces petites protéines (de 20 à 30 kDa, soit ~200 acides aminés) sont présentes dans toutes les cellules eucaryotes, et la famille compte des centaines de membres

III.A.1. Ras

Ras, le chef de file de cette superfamille, a été abondamment étudié. Initialement, les protéines Ras ont été identifiées dans les années 1980 comme les produits d'expression de virus oncogènes (H-Ras et K-Ras, pour les virus de Harvey et Kirsten, respectivement).

Des homologues cellulaires (proto-oncogènes) ont été ensuite identifiés, dont notamment p21-Ras. p21-Ras et les protéines qui lui sont apparentées jouent un rôle majeur dans la transduction des signaux régulant la prolifération et la division cellulaire, notamment par la cascade Raf/MEK/ERK, aboutissant à l'activation de certains facteurs de transcription.

Les études sur les Ras (virales et cellulaires) ont permis de jeter des bases importantes pour l'étude ultérieure des autres protéines G ; par exemple, de nombreuses mutations fréquemment utilisées pour l'étude de ces protéines sont inspirées de mutants (naturels ou artificiels) des Ras virales, entraînant par exemple l'incapacité à hydrolyser le GTP (voir la partie consacrée au mutants ponctuels de Rab3).

III.B. Les protéines Rab/Ypt

La compréhension des mécanismes moléculaires sous-tendant le trafic vésiculaire intracellulaire, et le phénomène sécrétoire en particulier, doit beaucoup aux travaux réalisés sur la levure. Les premiers représentants de la famille Rab ont été identifiés chez cet organisme ; ainsi, des défauts des gènes YPT1 et SEC4 provoquent une accumulation de vésicules sécrétoires, soit par blocage d'une étape de transport entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique pour Sec4p (Salminen *et al.*, 1987; Goud *et al.*, 1988), soit par blocage entre le réticulum endoplasmique et le cis-Golgi pour Ypt1p (Schmitt *et al.*, 1988; Segev *et al.*, 1988). Par la suite, de nombreuses protéines présentant de forts degrés d'identité avec Ypt1p ont été isolées chez les mammifères, et regroupés dans la famille des Rab (*Rat Brain*, car initialement isolées à partir d'une banque d'ADNc de cerveau de rat, voir Touchot *et al.*, 1987).

La famille Rab (voir Darchen *et al.*, 2000 pour une revue sur Rab3 et Rab6) est à présent la branche la plus étendue de la superfamille de Ras, puisque selon les analyses, le génome humain contiendrait 63 gènes codant des Rab. Pour comparaison, *S. cerevisiae* en compterait 11, *C. elegans* 29, et *D. melanogaster* 26 (Bock *et al.*, 2001).

III.B.1. Structure et déterminants communs

Toutes les protéines rassemblées au sein de la famille Rab partagent un certain nombre d'éléments communs intangibles, comme des déterminants structuraux majeurs liés à l'activité d'hydrolyse du GTP par ces protéines. Ces éléments sont identifiables par l'étude des alignements des séquences primaires de ces protéines et de leur structure cristallographique. Pour l'heure, peu de structures de Rab ont été résolues. Il s'agit, chez les mammifères, de Rab3a (Dumas *et al.*, 1999; Ostermeier *et al.*, 1999), Rab7 (Brachvogel *et al.*, 1997) Rab5c (Merithew *et al.*, 2001) et Rab5a (Zhu *et al.*, 2003). Chez la levure, on compte Ypt51p (Esters *et al.*, 2000), Sec4p (Stroupe *et al.*, 2000) et Ypt7p (Constantinescu *et al.*, 2002). Pour Rab3a, la structure a été déterminée pour la protéine seule ou co-cristallisée avec un de ses effecteurs, la Rabphilin3a ; on notera la très grande similitude des structures tridimensionnelles de Rab3a et de Ras, dont la structure a également été résolue (voir Figure 36). De façon générale, la partie carboxyterminale des Rab, qui est impliquée dans l'adressage des Rab, est la plus

divergente au sein de la famille, tandis que les régions responsables de la liaison des nucléotides sont plus conservées.

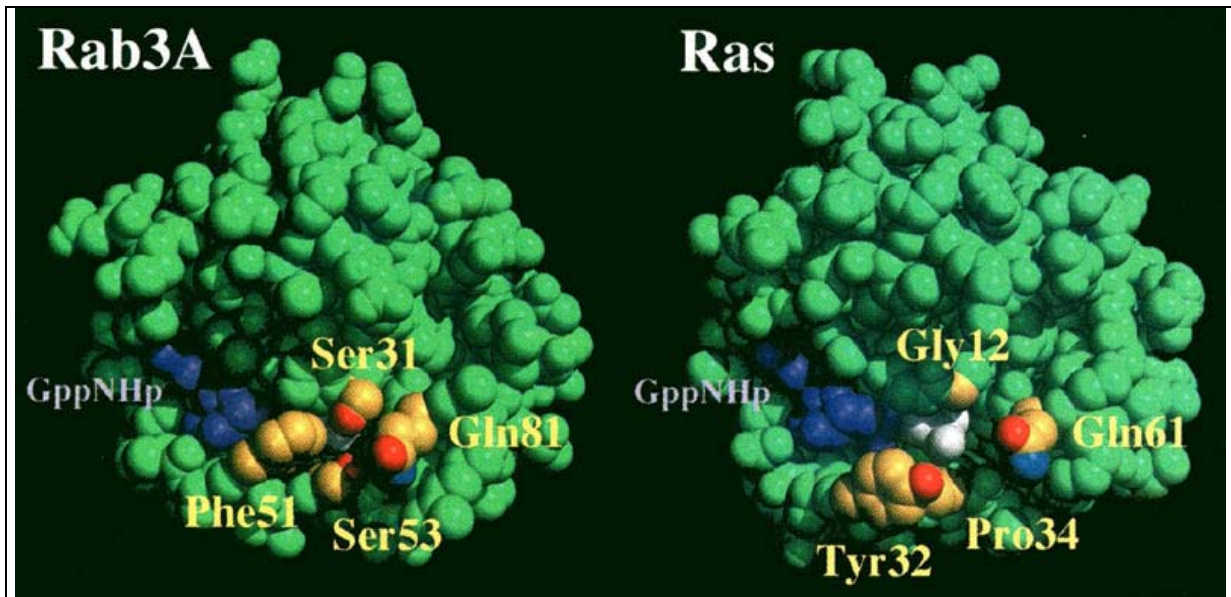


Figure 36

Structures tridimensionnelles de Rab3a et de Ras. On remarque la grande similarité des structures, en particulier au niveau du site catalytique. Le nucléotide est représenté en bleu (phosphate γ en blanc) et les aminoacides le contactant, en jaune. Les atomes d'oxygène et d'azote des aminoacides importants sont représentés en rouge et bleu, respectivement. La différence principale entre les sites catalytiques de Rab3a et de Ras consiste en l'enfouissement du phosphate γ pour Rab3a, alors qu'il est accessible au solvant dans Ras. Le résidu glutamine, en position 81 de Rab3a et 61 pour Ras est directement impliqué dans l'hydrolyse du GTP. La sérine 31 de Rab3a (absente de Ras) jouerait un rôle dans le maintien en conformation active de la protéine en empêchant l'approche de la glutamine 81 pour l'hydrolyse du GTP. La phénylalanine 51 de Rab3 (équivalente à la tyrosine 32 de Ras) empêche la dissociation du nucléotide par une interaction de type Van der Waals avec le ribose. La sérine 53 (proline 34 chez Ras), comme la glutamine 81, stabiliserait l'état de transition, par interaction avec le phosphate γ . Tiré de Dumas *et al.*, 1999.

III.B.1.a. Boucle P

Ce déterminant est commun à toutes les GTPases et ATPases ; il s'agit du motif GX4GK(S/T). On peut voir, sur les structures tridimensionnelles de Rab3 cristallisé avec les analogues de nucléotides que ce domaine, situé dans la région L1- α 1 (aminoacides 29 à 36 de Rab3), contient une sérine en position 31 interagissant avec le phosphate γ du GTP, limitant ainsi l'approche de la glutamine 81, indispensable à l'hydrolyse (voir Figure 36). On notera que certaines mutations oncogéniques naturelles observées chez Ras concerne la glycine 12, homologue de Ser 31 de Rab3 ; de telles mutations rendent Ras insensible à sa GAP (GTPase Activating Protein, la protéine aidant à l'hydrolyse du GTP ; voir partie consacrée au cycle de Rab3) et donc lié plus longtemps au GTP.

III.B.1.b. Régions "switch"

Les régions "switch" (ou "charnières"), au nombre de 2, subissent un remaniement conformationnel en fonction de la nature du nucléotide lié (GDP ou GTP). Ces régions sont importantes à deux titres ; d'une part, elles comportent des résidus cruciaux pour le mécanisme d'hydrolyse du GTP ; d'autre part, comme ces régions adoptent des conformations distinctes selon l'état de liaison au nucléotide, elles sont le siège principal de la reconnaissance par les effecteurs, par définition spécifiques de l'état de liaison au GTP.

III.B.1.b.i. Switch I

La région "switch I", encore dénommée boucle effectrice ("Loop 2", aminoacides 49 à 57 de Rab3) comporte le résidu Thr 54 qui contacte les phosphates β et γ du GTP, par l'intermédiaire de l'ion Mg^{2+} qui l'accompagne. Les résidus Phe 51 et Ser 53 sont également importants pour la stabilisation du nucléotide au site actif, cette fois par des interactions de type Van der Waals avec la partie sucrée du nucléotide (ribose). De plus, le résidu Ser 53 joue un rôle dans la stabilisation de l'état de transition en interagissant avec le phosphate γ du nucléotide. On notera que ce résidu Ser 53 est présent exclusivement chez les Rab impliquées dans des étapes de transport vers ou depuis la membrane plasmique (Rab3, 4, 5, 11, 18, 20, 23) ; de plus, la présence de Ser 53, qui peut pivoter et faciliter l'hydrolyse du GTP, confère aux Rab le possédant une vitesse d'hydrolyse du GTP plus élevée. Ainsi, Rab3 et Rab5 ont une vitesse d'hydrolyse bien plus élevée que Rab7, par exemple, qui ne le possède pas.

III.B.1.b.ii. Switch II

Cette région comprend β 3-L5 (aminoacides 76 à 95 de Rab3) ; les deux déterminants majeurs de cette région sont le motif DX2G, contactant le phosphate γ , ainsi que le résidu Gln 81, directement impliqué dans l'hydrolyse du GTP et la stabilisation de l'état de transition.

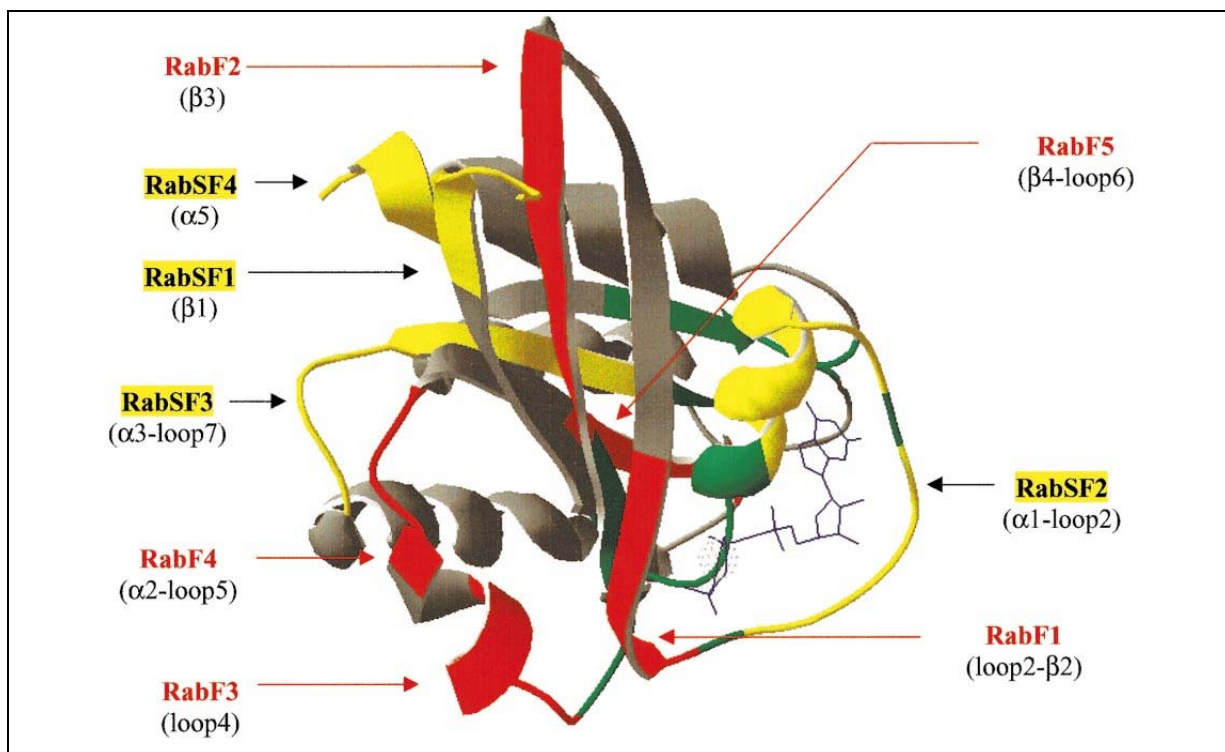


Figure 37

Structure de Rab3a. les régions dénommées RabF(1 à 5, représentée en rouge) sont des régions fortement conservées parmi toutes les Rab ; les régions RabSF (sous-famille, de 1 à 4) constituent des zones similaires au sein d'une sous famille donnée (ex rab3a, b, c et d ; en jaune). Les régions contactant le nucléotide sont représentées en vert. Tiré de Pereira-Leal *et al.*, 2000.

III.B.1.c. Rab-CDR

L'observation de la structure du co-cristal de Rab3a et de la Rabphiline3a (Figure 44) montre que les régions "switch", dont la conformation est très affectée selon la nature du nucléotide lié, ne sont pas les seules régions de contact entre Rab3 et ses effecteurs (au moins la Rabphiline) ; ces domaines complémentaires, dénommés CDR (pour Complementary Determining Region" sont au nombre de 4 : CDR-1 (positions 19 à 22 de Rab3), CDR-2 (93 à 96), CDR-3 (124 à 128) et CDR-4 (182 à 193). La comparaison des séquences primaires de Rab3 avec ceux d'autres Rabs montre que si les CDR sont très bien conservés au sein du groupe Rab3, ils divergent des CDR d'autres groupes de la famille Rab ; ceci pointe le rôle des CDRs comme déterminants de première importance de la spécificité des effecteurs reconnus. Le CDR-2, compris dans la boucle $\alpha 2$ - $\beta 4$, contacte le motif SGAWFF de la Rabphiline. On retrouve cette importance des CDR dans l'interaction d'autres Rab avec leurs effecteurs respectifs. Par exemple, les deux isoformes de Rab6 (Rab6a et Rab6a') ne diffèrent

que par deux résidus situées dans la boucle α 2- β 4 (position équivalente du CDR-2 de Rab3), ce qui entraîne l'interaction (Rab6a) avec un effecteur (la rabkinesine6) ou l'absence d'interaction (Rab6a' ; Echard *et al.*, 2000).

III.B.1.d. Motifs NKXD et EXSAK

Le motif structural NXXD (positions 135 à 138 de Rab3) permet la stabilisation du nucléotide au site actif. Enfin, le motif EXSAK (positions 163 à 167 de Rab3a) permet une stabilisation de la molécule.

III.B.2. Mutants ponctuels

La compréhension des mécanismes d'actions des petites GTPases de la famille de Ras a énormément bénéficié de l'étude des mutants oncogéniques de Ras. Par analogie avec ces mutations ponctuelles bien étudiées, des mutations équivalentes ont été réalisées sur les protéines Rab. Les mutants de Rab3 qui ont été principalement étudiés au laboratoire sont les suivants (voir Figure 38) :

Mutation T36N : le remplacement au sein de la boucle P (voir ci-dessus) du résidu en position 36 entraîne une importante diminution de l'affinité pour le GTP. Ce mutant reste ainsi probablement sous forme libre, i.e. sans nucléotide, ou bien faiblement lié au GDP (Burstein *et al.*, 1992).

Mutation V55E : cette mutation, située dans la boucle dite effectrice (ou switch I), n'entraîne pas de conséquence pour la liaison du mutant au nucléotide (Burstein *et al.*, 1992). En revanche, celui-ci perd son interaction avec RIM et la Rabphilin, deux effecteurs de Rab3 (McKiernan *et al.*, 1993; Coppola *et al.*, 1999) ainsi qu'avec Rab3-GAP (Burstein *et al.*, 1992; Clabecq *et al.*, 2000).

Mutation Q81L : cette mutation affecte directement la capacité d'hydrolyse du GTP par Rab3 ; la Gln81 est en effet indispensable à la catalyse de la réaction d'hydrolyse et son remplacement en Leu abolit cette activité, même en présence de Rab3-GAP (Clabecq *et al.*, 2000). Le mutant résultant reste ainsi constitutivement bloqué dans sa forme active (Brondyk *et al.*, 1993). C'est l'effet de ce mutant sur la sécrétion régulée que j'ai principalement étudié au cours de ma thèse.

Mutation N135I : de façon un peu comparable à la mutation T36N qui entraîne la perte d'affinité pour le GTP, le remplacement de Asn 135 en Ile induit une perte d'affinité pour les deux nucléotides (GTP et GDP) ; le mutant résultant, ne liant plus ou très faiblement les nucléotides, ne semble plus se structurer correctement (Brondyk *et al.*, 1993) ; malgré un effet sur la sécrétion régulée (voir partie sur Rab3), du fait que sa conformation au sein de la cellule est incertaine, il n'est plus guère étudié.

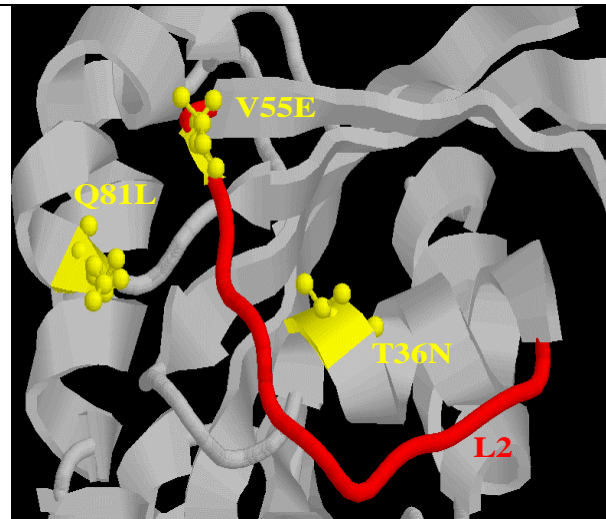
Figure 38

Principaux mutants utilisés au laboratoire pour l'analyse de la fonction de Rab3a dans le contrôle de la sécrétion.

La mutation Thr36→Asn, au sein de la boucle P, entraîne une forte diminution d'affinité pour le GTP. Le mutant résultant est majoritairement lié au GDP, donc sous forme inactive.

Le remplacement Gln81→Leu affecte la capacité d'hydrolyse du GTP ; la forme mutée est liée préférentiellement au GTP (forme active).

La substitution Val55→Glu dans la boucle L2 (switch I) abolit l'interaction de Rab3a avec certains effecteurs, comme RIM ou la Rabphiline et également avec Rab3-GAP.



III.B.3. Rôle dans le trafic membranaire et localisation sub-cellulaire

Les études menées chez la levure et les cellules de vertébrés ont abondamment montré que les Rab sont associées avec les différentes étapes du trafic vésiculaire intracellulaire. De façon générale, une Rab distincte est associée à chaque étape de transport vésiculaire, mais il arrive qu'une Rab donnée soit associée avec deux étapes de transport, comme c'est le cas pour Rab1. Ceci compromet une hypothèse proposant que les Rab soient les déterminants de la spécificité d'adressage du transport intracellulaire (Simons *et al.*, 1993).

C'est la région carboxyterminale, la plus variable, qui contient l'information permettant l'adressage d'une Rab vers son (ses) compartiment(s). Cependant, les modalités et les acteurs moléculaires de cet adressage ne sont pas encore bien connus. C'est également dans cette région C-terminale, sur les tous derniers aminoacides que se réalise la géranyl-géranylation, une modification post-traductionnelle importante pour la fonction des Rab.

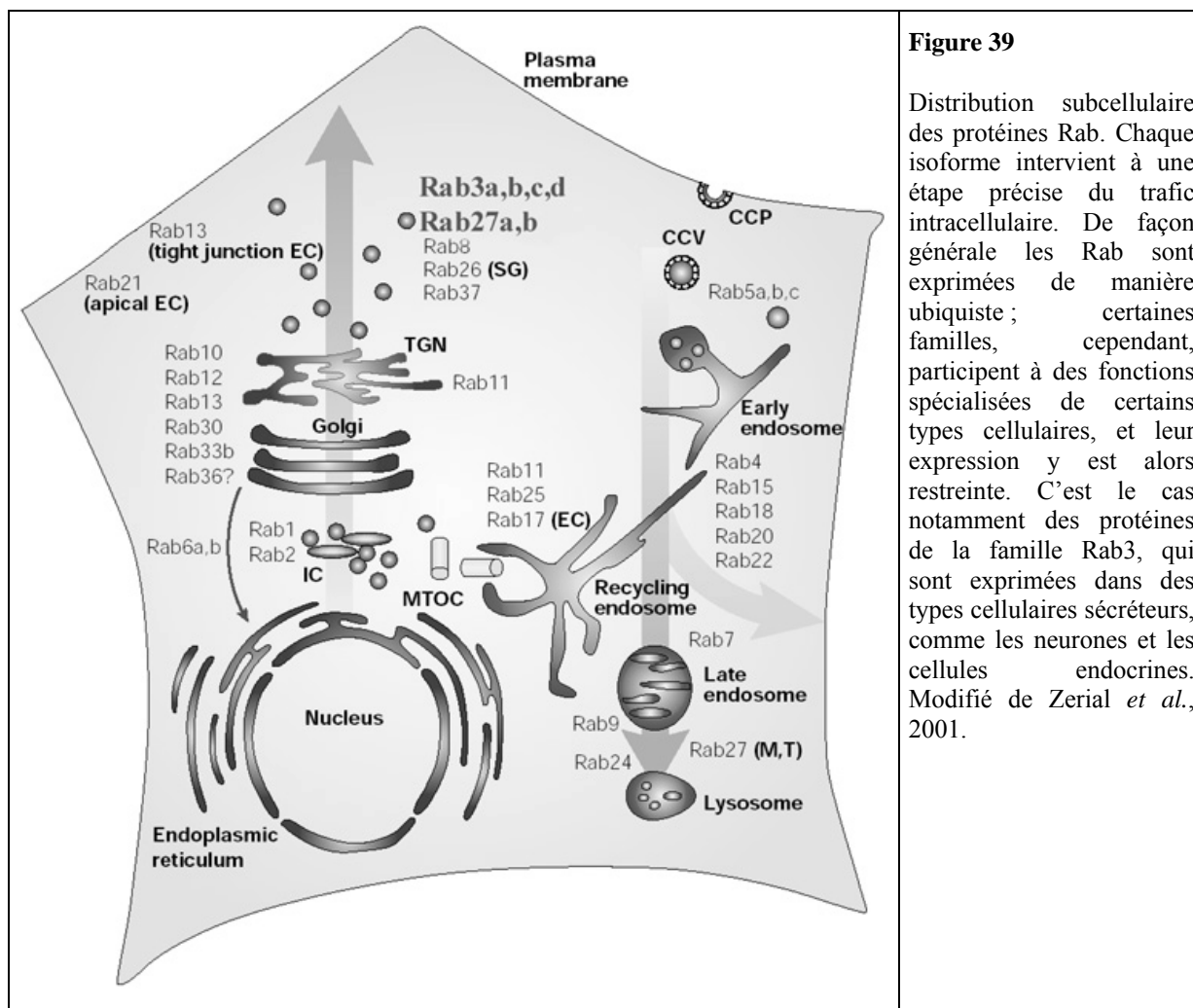


Figure 39

Distribution subcellulaire des protéines Rab. Chaque isoforme intervient à une étape précise du trafic intracellulaire. De façon générale les Rab sont exprimées de manière ubiquiste ; certaines familles, cependant, participent à des fonctions spécialisées de certains types cellulaires, et leur expression y est alors restreinte. C'est le cas notamment des protéines de la famille Rab3, qui sont exprimées dans des types cellulaires sécréteurs, comme les neurones et les cellules endocrines. Modifié de Zerial *et al.*, 2001.

III.C. Les protéines Rab3

Les protéines de la sous-famille Rab3 sont au nombre de 4 chez les mammifères (Rab3a, b, c et d). Les données issues du séquençage du génome humain suggèrent que la famille Rab3 soit au complet avec ces 4 membres. Ces protéines sont codées par 4 gènes distincts. Chez *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* ou encore *Aplysia californica*, une seule isoforme a été décrite (ici de même, les données des séquençages, achevés dans les cas de la drosophile et du nématode, indiquent que l'unicité de Rab3 est confirmée). Les quatre isoformes de mammifères partagent environ 75 % d'identité de séquence. Cette identité est encore plus forte (> 82%) si l'on considère leurs domaines centraux, tandis que les domaines carboxyterminaux sont plus divergents.

III.C.1. Localisation et expression

III.C.1.a. Localisations cellulaire et subcellulaire

La famille Rab3 présente, à l'inverse d'autres Rab qui sont exprimées de façon relativement ubiquiste, une expression plus restreinte à certains types cellulaires spécialisés dotés de sécrétion régulée, en particulier neuronaux ou endocrines. Ainsi, les membres de cette famille sont retrouvés associés spécifiquement aux vésicules synaptiques des neurones (Fischer von Mollard *et al.*, 1990), aux granules et micro-vésicules sécrétoires des cellules chromaffines (Darchen *et al.*, 1990; Darchen *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1997a) et PC12 (Weber *et al.*, 1996), ainsi qu'aux grains de sécrétion des cellules β des îlots de Langerhans (Regazzi *et al.*, 1996). La forte similarité de leurs séquences suggère une certaine redondance fonctionnelle. On notera d'ailleurs qu'après surexpression dans des cellules β ou PC12, les 4 isoformes se retrouvent associées aux granules de sécrétion (Iezzi *et al.*, 1999). Cependant, les profils d'expressions tissulaire et cellulaire des quatre isoformes ne sont pas identiques, suggérant des rôles distincts, même si ces profils ne sont pas totalement mutuellement exclusifs.

III.C.1.a.i. Rab3a

Rab3a est la première isoforme découverte (Zahraoui *et al.*, 1988) ; évidemment dénommée simplement Rab3 (ou encore p25/smg) avant la découverte des autres membres, c'est sans doute l'isoforme de Rab3 la plus étudiée. Elle est majoritairement retrouvée dans le cerveau et les cellules endocrines. C'est l'isoforme la plus abondante dans le cerveau, où elle représenterait 25% des Rab. Elle n'est pas seulement neuronale, mais aussi macrogliale, avec une prépondérance dans les cellules oligodendrocytaires (Madison *et al.*, 1996). Elle est abondante dans les cellules chromaffines, et dans la lignée dérivée PC12, où elle est associée aux LDCV et SLV (Darchen *et al.*, 1990; Darchen *et al.*, 1995; Weber *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1997a). Rab3a est également présente au niveau de l'acrosome des spermatozoïdes, dont elle contrôlerait la fusion (Iida *et al.*, 1999) et dans la glande parathyroïde (Huang *et al.*, 1999).

Rab3a	Tableau 1 : Localisation de Rab3a	
	Macroglie (oligodendrocytes)	(Madison <i>et al.</i> , 1996)
	Lignée PC12 (phéochromocytome)	(Johannes <i>et al.</i> , 1994; Weber <i>et al.</i> , 1996)
	Cellules chromaffines de la médullosurrénale	(Darchen <i>et al.</i> , 1990; Darchen <i>et al.</i> , 1995)
	Spermatozoïdes	(Iida <i>et al.</i> , 1999)
	Glande parathyroïde (cellules chiefs)	(Huang <i>et al.</i> , 1999)
	Neurones adénohypophysaires	(Redecker <i>et al.</i> , 1995)
	Lignées GLUTag et STC-1 (sécrétion de cholécystokinine)	(Gevrey <i>et al.</i> , 2001)
	Parathyroïde	(Huang <i>et al.</i> , 1999)
	Lignée neuroendocrine AtT-20	(Martelli <i>et al.</i> , 1995)
	Lignée pancréatique AR42J	(Klengel <i>et al.</i> , 1997)
	Lignées sécrétrices d'insuline RINm5F, INS-1, HIT-T15, pancréas (rat)	(Regazzi <i>et al.</i> , 1996)
	Ostéoclastes	(Abu-Amer <i>et al.</i> , 1999)
	Ovocyte (souris)	(Masumoto <i>et al.</i> , 1998)
	Cerveau	(Stettler <i>et al.</i> , 1995)
	Lignée RBL (mastocytes)	(Carroll <i>et al.</i> , 2001)
	Cellules épithéliales de la glande mammaire	(Vadlamudi <i>et al.</i> , 2000)

III.C.1.a.ii. Rab3b

C'est la seconde isoforme fortement exprimée dans le cerveau. Cependant, il ne se trouve que 2 régions où le niveau d'expression de Rab3b égale, voire dépasse, celui de Rab3a, le bulbe olfactif et l'antéhypophyse, respectivement (Stettler *et al.*, 1995). Globalement, Rab3a et Rab3b sont exprimées dans les mêmes populations neuronales (Stettler *et al.*, 1995), même s'il semble que certaines cellules n'expriment que l'une ou l'autre, ou encore aucune des deux, du moins à des niveaux accessibles à l'étude. On notera l'abondance de Rab3b dans les astrocytes (Madison *et al.*, 1996). En plus de son expression neuronale, Rab3b est également retrouvée dans certaines cellules épithéliales comme le foie, l'intestin grêle, le colon, et le rein (Weber *et al.*, 1994). Elle est impliquée dans la sécrétion des cellules lactotropes de l'antéhypophyse, où elle est vraisemblablement associée aux granules de sécrétion (Lledo *et al.*, 1993). L'isoforme Rab3a y serait également exprimée, quoiqu'à des taux bien plus faibles (Redecker *et al.*, 1995). Au niveau des cellules chromaffines bovines, son profil semble différent de ceux de Rab3a et Rab3c (massivement présentes sur les LDCV et SLV) car essentiellement présente à la membrane plasmique (Lin *et al.*, 1997a). Dans les cellules PC12 cependant, son profil est comparable à celui de Rab3a (Weber *et al.*, 1996).

Rab3b	Tableau 2 : Localisation de Rab3b	
	Cerveau (bulbe olfactif, antéhypophyse)	(Stettler <i>et al.</i> , 1995)
	Macroglie (astrocytes)	(Madison <i>et al.</i> , 1996)
	Epithéliums (foie, intestin grêle, colon, partie distale du rein)	(Weber <i>et al.</i> , 1994)
	Corpus luteum	(Al-Matubsi <i>et al.</i> , 1999)
	Parathyroïde	(Huang <i>et al.</i> , 1999)
	Foie, îlots pancréatiques	(Field <i>et al.</i> , 2001)
	Plaquettes sanguines	(Karniguan <i>et al.</i> , 1993)
	Lignée pancréatique AR42J	(Klengel <i>et al.</i> , 1997)
	Ostéoclastes	(Abu-Amer <i>et al.</i> , 1999)
	Cellules lactotropes de l'antéhypophyse	(Lledo <i>et al.</i> , 1993) (Tasaka <i>et al.</i> , 1998)
	Cellules chromaffines de la médullosurrénale (membrane plasmique)	(Lin <i>et al.</i> , 1997a)
	Lignée MEG- 01 (megakaryoblastic leukaemia)	(Nagata <i>et al.</i> , 1997)
	Lignée MDCK (épithélium de rein canin)	(van <i>et al.</i> , 2002)
	Lignées épithéliales T84, HT29-CL19A	(Weber <i>et al.</i> , 1994)
	PC12	(Weber <i>et al.</i> , 1996)
	Mastocytes	(Oberhauser <i>et al.</i> , 1994)
	Lignées sécrétrices d'insuline RINm5F, INS-1, HIT-T15, pancréas (rat et humain)	(Regazzi <i>et al.</i> , 1996)
Adipocytes	(Cormont <i>et al.</i> , 1993)	

III.C.1.a.iii. Rab3c

De même que Stettler et coll. (Stettler *et al.*, 1995) avaient montré que Rab3a et Rab3b sont souvent associées au sein des mêmes neurones, Rab3a et Rab3c sont, elles, souvent associées au niveau de la macroglie, avec un enrichissement commun dans les oligodendrocytes (Madison *et al.*, 1996).

L'expression de Rab3c n'est pas exclusivement neuronale, comme l'atteste sa présence dans les testicules, le cœur et le tissu adipeux (Su *et al.*, 1994), le pancréas exocrine (Piiper *et al.*, 2001), la lignée sécrétrice d'insuline (INS-1) (Iezzi *et al.*, 1999), et la parathyroïde bovine (Huang *et al.*, 1999). Son profil d'expression dans les cellules chromaffines bovines et les PC12 est similaire à celui de Rab3a (Weber *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1997a).

Rab3c	Tableau 3 : Localisation de Rab3c	
	Adipocytes	(Cormont <i>et al.</i> , 1993)
	Lignée PC12, testicule, coeur, tissu adipeux	(Su <i>et al.</i> , 1994)
	Cellules musculaires cardiaques	(Uphues <i>et al.</i> , 1995)
	Lignées sécrétrices d'insuline RINm5F, INS-1, HIT-T15, pancréas (rat et humain)	(Regazzi <i>et al.</i> , 1996)
	Glie (oligodendrocytes)	(Madison <i>et al.</i> , 1996)
	Cellules chromaffines	(Lin <i>et al.</i> , 1997a)
	Lignée AR42J (pancréas exocrine)	(Klengel <i>et al.</i> , 1997)
	Ostéoclastes	(Abu-Amer <i>et al.</i> , 1999)
	Lignée à insuline INS-1	(Iezzi <i>et al.</i> , 1999)
	Cellules chiefs de la glande parathyroïde	(Huang <i>et al.</i> , 1999)
	Lignée RBL (mastocytes)	(Carroll <i>et al.</i> , 2001)
	Cerveau, cartilage, villosités intestinales, chondrocytes	(Pavlos <i>et al.</i> , 2001)
	Lignée GLUTag (cellules à cholecystokinine)	(Gevrey <i>et al.</i> , 2001)

III.C.1.a.iv. Rab3d

Rab3d est sans doute l'isoforme dont l'expression tissulaire est la plus hétérogène. C'est en tout cas celle dont l'expression est majoritairement extérieure au cerveau. Elle serait ainsi trouvée (du moins son transcrit d'ARN) dans tous les tissus testés, et en particulier dans le cœur, le poumon et le foie (Adachi *et al.*, 2000). La présence de la protéine est confirmée au niveau des hépatocytes (Field *et al.*, 2001). Elle est abondante dans les adipocytes, où elle a été découverte (Baldini *et al.*, 1992), et elle pourrait notamment y être associée aux vésicules portant le récepteur du glucose GLUT4. Cependant des études plus récentes semblent montrer que Rab4 serait plus à même d'opérer une régulation de la translocation de GLUT4 dans ces cellules (Shibata *et al.*, 1996). Elle est aussi retrouvée sur les granules zymogènes des cellules exocrines du pancréas (Piiper *et al.*, 1995; Ohnishi *et al.*, 1996; Valentijn *et al.*, 1996), de l'estomac (cellules "chief" et cellules de type enterochromaffines), des glandes parotides et lacrymales, et enfin de l'intestin (cellules de Paneth) (Ohnishi *et al.*, 1996), partageant ainsi quelques localisation de Rab3b (voir ci-dessus).

Enfin, elle est trouvée associée aux granules de sécrétion des mastocytes (Oberhauser *et al.*, 1994), où elle pourrait contrôler l'appariement des SNARES, via son action sur une Ser/Thr kinase, Rak3D (Pombo *et al.*, 2001). Peu de données sont disponibles quant à sa présence dans les cellules chromaffines et PC12, même si elle a pu y être détectée (Chung *et al.*, 1999).

Rab3D	Tableau 4 : Localisation de Rab3d	
	Adipocytes	(Baldini <i>et al.</i> , 1992)
	Lignée neuroendocrine AtT-20	(Martelli <i>et al.</i> , 1995)
	Cellules chief et de type entérochromaffines de l'estomac, glandes lacrymales et parotides, cellules de Paneth (intestin).	(Ohnishi <i>et al.</i> , 1996)
	Cellules chief de l'estomac (sécrétion de pepsinogène)	(Raffaniello <i>et al.</i> , 1996)
	Cellules acinaires pancréatiques	(Valentijn <i>et al.</i> , 1996)
	Lignée pancréatique AR42J	(Klengel <i>et al.</i> , 1997)
	Lignée granulocytaire HT93A	(Nishio <i>et al.</i> , 1999)
	Parathyroïde	(Huang <i>et al.</i> , 1999)
	Lignée RBL (mastocytes)	(Tuvim <i>et al.</i> , 1999)
	Lignée PC12	(Chung <i>et al.</i> , 1999)
	Coeur, poumon, foie	(Adachi <i>et al.</i> , 2000)
	Hépatocytes	(Larkin <i>et al.</i> , 2000)
	Lignées GLUTag et STC-1 (sécrétion de cholecystokinine)	(Gevrey <i>et al.</i> , 2001)
Foie, glandes de Ebner, pancréas, glandes parotides	(Field <i>et al.</i> , 2001)	

III.C.2. Cycle fonctionnel des protéines Rab et des Rab3 en particulier. Importance des régulateurs de l'activité de Rab3

Comme toutes les petites GTPases, Rab3 oscille entre deux conformations, une forme liée au GDP (dite inactive) et une forme liée au GTP (dite active). En général, au sein d'une même cellule, la forme GDP d'une Rab est trouvée dans le cytosol, et la forme liée au GTP associée à la membrane d'un compartiment intracellulaire. Le cycle lié à ce changement de conformation et de localisation fait intervenir de nombreuses protéines régulatrices. Le cycle présenté ci-après est basé sur l'exemple particulier de Rab3, mais les grandes lignes en sont communes à la majorité des protéines Rab.

III.C.2.a. Isoprénylation

Le premier événement intervenant juste après la synthèse des protéines Rab, comme pour d'ailleurs la plupart des protéines de la super-famille Ras, est la prénylation, consistant en l'ajout sur des cystéines carboxyterminales de groupements hydrophobes géranyl-géranyl (isoprényl en C20, ajout d'un seul isoprényl dans le cas d'un motif C-C et de deux isoprényls dans le cas d'un motif C-X-C comme pour Rab3). Cette réaction est catalysée par une enzyme hétérodimérique, la Rab géranyl-géranyl transférase de type II (GGTase II), composée de deux sous-unités α et β (voir Figure 40).

Préalablement à cette géranylation, les Rab doivent être prises en charge par la Rab Escort Protein (REP), qui les présente à la partie catalytique de la GGTase II (Shen *et al.*, 1996). Cette modification post-traductionnelle est importante car elle stabilise la liaison des Rab aux membranes cibles (Chavrier *et al.*, 1991).

Figure 40

Structure de la GGTase de type II. La sous-unité β est représentée en violet, la sous-unité α en cyan, à l'exception de son domaine LRR (Leucine Rich Repeat, en vert) et de son domaine de type immunoglobuline (Ig-like, en jaune). Ces deux derniers domaines constituent la particularité de la GGTase α vis-à-vis de la farnésyltransférase et de la GGTase de type I. D'après Zhang *et al.*, 2000.

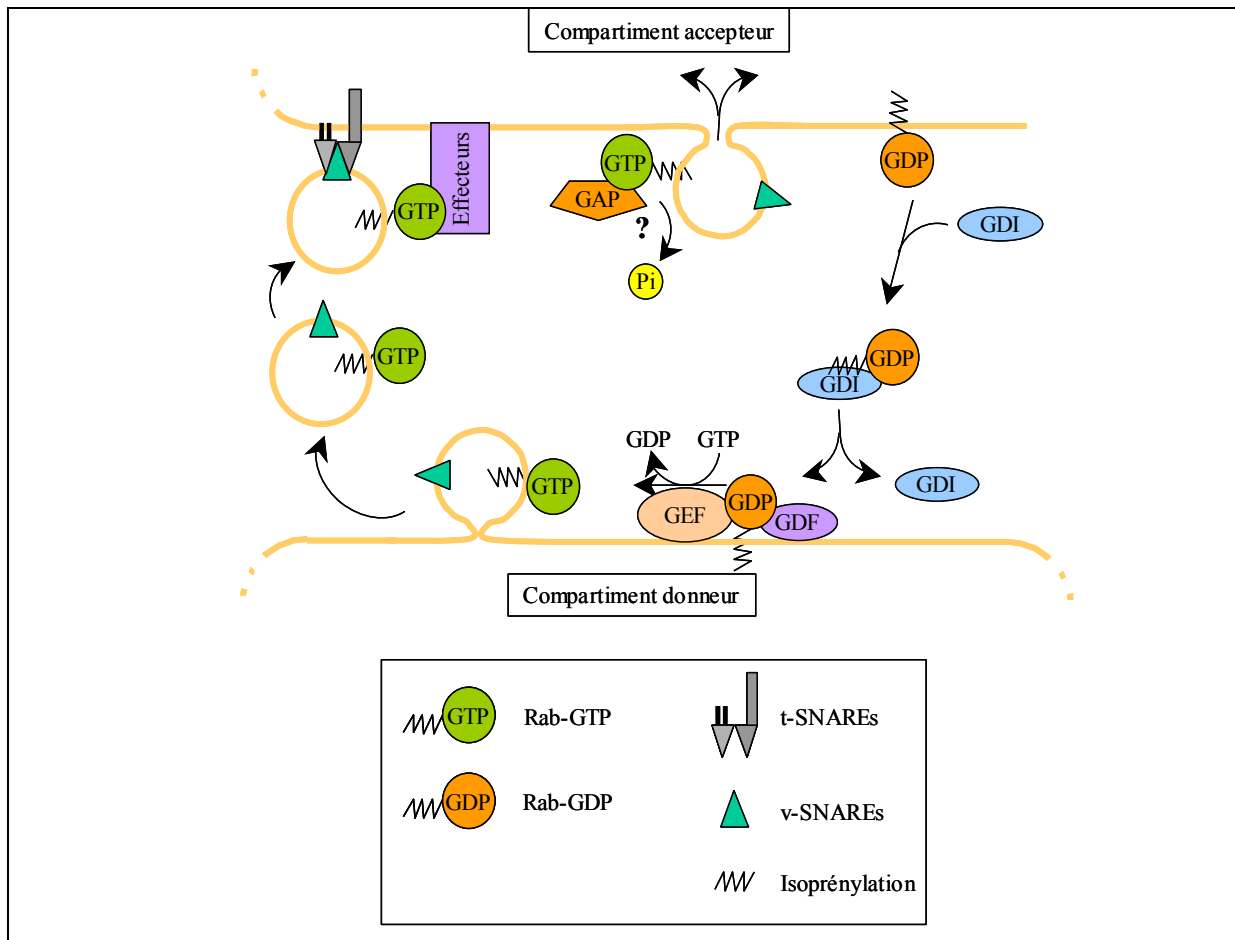
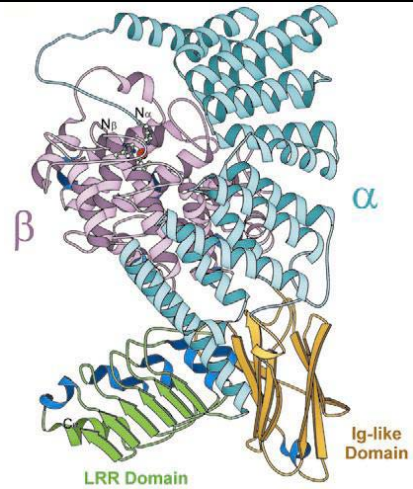


Figure 41

Une vue très simplifiée du cycle fonctionnel des protéines Rab. Voir le texte pour le détail des différentes étapes.

III.C.2.b. Prise en charge par Rab-GDI, association à la membrane des VS

La protéine Rab3A-GDI (GDP Dissociation Inhibitor, 55 kDa, voir Figure 42) a été identifiée à l'origine comme un inhibiteur de l'échange GDP-GTP sur la protéine Rab3a (Sasaki *et al.*, 1990), bien que Rab3A-GDI agisse en fait sur toutes les protéines Rab (1 à 11, au moins ; Ullrich *et al.*, 1993) d'où la proposition de la rebaptiser plus simplement en Rab-GDI.

En fait, il existe chez les mammifères deux classes de Rab-GDI (α et β), dont l'expression est variable suivant les tissus. On trouve généralement une seule isoforme α et une seule isoforme β par organisme considéré. L'isoforme Rab-GDI α est l'isoforme prédominante dans le cerveau et les cellules pancréatiques à insuline. La plupart des Rab lient les deux isoformes, même si l'équivalence des complexes ainsi formés n'est pas définie (Yang *et al.*, 1994). Il a cependant été démontré que certaines Rab lient préférentiellement l'une ou l'autre isoforme de Rab-GDI, amenant ainsi la question de la fonctionnalité des différents complexes possibles (Erdman *et al.*, 2001).

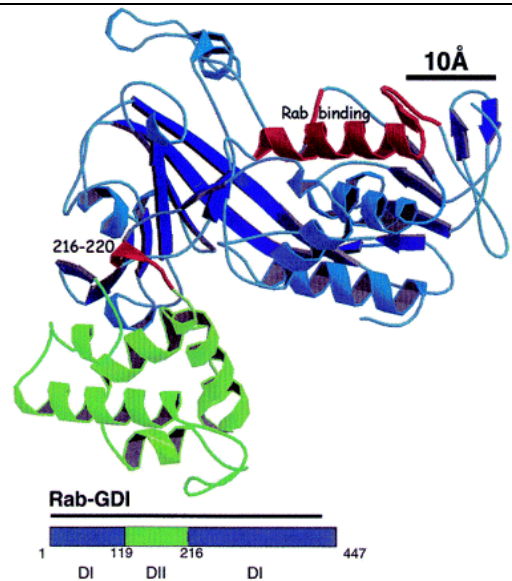
Le rôle de l'association Rab/Rab-GDI est double : elle permet, d'une part, de maintenir les protéines Rab isoprénylées en solution dans le cytosol, d'autre part de les extraire de leur membrane cible lorsqu'elles sont liées au GDP (Regazzi *et al.*, 1992; Soldati *et al.*, 1993; Ullrich *et al.*, 1993). En effet, à la différence de REP, GDI ne lie que les formes matures isoprénylées de Rab3 liées au GTP (Pfeffer, 1994).

Si la Rab-GDI peut contribuer à la spécificité du recrutement des protéines Rab sur leur membrane cible (cas de Rab9 et Rab5, Dirac-Svejstrup *et al.*, 1994; Horiuchi *et al.*, 1995, respectivement), cela ne peut pas être généralisé à toutes les Rab, comme le montre l'exemple de Rab1, pour laquelle Rab-GDI semble facultative pour le recrutement à la surface du réticulum endoplasmique (Wilson *et al.*, 1996).

Le rôle des Rab-GDI serait double, servant de protéines chaperons aux Rab et de navette les orientant sur l'organelle appropriée ; cette dernière fonction pourrait aussi être assurée par REP (Alexandrov *et al.*, 1994).

Figure 42

Structure tridimensionnelle de la Rab-GDI. Cette protéine est constituée de 2 domaines (DI en bleu, DII en vert). La région 232-259 (en rouge) est impliquée dans la liaison de Rab-GDI aux Rab. Le motif situé entre les positions 216-220 semble important pour la liaison de Rab-GDI aux membranes. Tiré de Ybe *et al.*, 2000.



L'association de Rab3 à la membrane des vésicules de sécrétion nécessiterait ensuite la dissociation de Rab-GDI (Ullrich *et al.*, 1993). La protéine GDF (GDI Displacement Factor) catalyserait la dissociation du complexe formé par Rab-GDI et les protéines Rab dans le cas des Rab 5, 7 et 9, associées aux endosomes (Dirac-Svejstrup *et al.*, 1997). GDF pourrait ainsi servir de récepteur membranaire pour les complexes Rab/Rab-GDI et participer à la spécificité d'appariement des Rab avec leur membrane cible.

III.C.2.c. L'échange GDP/GTP

La protéine Rab nouvellement livrée à la membrane de l'organelle cible est liée au GDP. Trois protéines capables de catalyser l'échange du GDP pour le GTP sur les Rab sont connus.

III.C.2.c.i. Mss4

Ce facteur d'échange a été décrit comme actif *in vitro* sur les protéines Rab1, Rab3, Rab8, Rab10, Sec4p et Ypt1p, mais est sans effet sur Rab2, Rab4, Rab5, Rab6, Rab9 et Rab11 (Burton *et al.*, 1994). Peu de données sont disponibles sur la fonction *in vivo* de Mss4. Son véritable rôle reste discuté, dans la mesure où le groupe de Balch a démontré que Mss4 ne semblait pas être un véritable facteur d'échange (Nuoffer *et al.*, 1997)

III.C.2.c.ii. Aex-3 & Rab3-GEP

Deux facteurs d'échange fortement semblables ont été identifiés chez le nématode *C. elegans* et les mammifères, Aex-3 et Rab3-GEF (ou encore Rab3-GEP, pour Rab3 GDP/GTP Exchange Factor/Protein) respectivement (Iwasaki *et al.*, 1997; Wada *et al.*, 1997). La mutation de Aex-3 provoque une inhibition partielle de la transmission synaptique couplée à une délocalisation de Rab3 (Iwasaki *et al.*, 1997), suggérant un lien fonctionnel fort entre ces deux molécules. Peu de travaux ont été effectués sur Aex-3, mais le phénotype du KO de Aex-3 diffère de celui de Rab3 chez cet animal (voir la partie consacrée à Rab3), suggérant d'autres cibles que Rab3 pour Aex-3. En effet, il a récemment été démontré que Aex-3 interagissait avec Cab-1, une protéine au rôle mal défini (Iwasaki *et al.*, 2000). Ces données suggèrent néanmoins que le facteur d'échange de Rab3 chez *C. elegans* est essentiel à la localisation subcellulaire correcte de Rab3 dans le neurone.

De façon similaire, le phénotype du KO de Rab3-GEF chez la souris est sévère (mort rapide des souris à la naissance par insuffisance respiratoire (Tanaka *et al.*, 2001)), alors que le phénotype du KO de Rab3a est subtil (voir plus bas dans cette partie). Comme dans le cas du nématode, ceci suggère des rôles additionnels pour Aex-3 et Rab3GEF. Par exemple, le nombre de vésicules arrimées à la zone active est très affecté chez les animaux Rab3GEF *-/-*, alors qu'il est normal dans le KO de Rab3a chez la souris (on notera qu'il est cependant affecté dans le KO de Rab3 chez *C. elegans* ; Nonet *et al.*, 1997), suggérant l'éventualité d'une action de Rab3GEF sur d'autres Rab, impliquées dans la formation et le trafic des vésicules synaptiques.

III.C.2.c.iii. GRAB

Plus récemment, GRAB (Guanine nucleotide exchange factor for Rab3a), une nouvelle protéine douée d'une activité GEF sur Rab3a a été isolée (Luo *et al.*, 2001). GRAB lie les 4 isoformes de Rab3, mais pas Rab5. La surexpression de GRAB dans des cellules PC12 induit une inhibition de la libération, similaire à la surexpression des formes mutantes de Rab3 constitutivement liées au GTP. Inversement, la diminution de son expression par une stratégie antisens augmente cette sécrétion (Luo *et al.*, 2001). GRAB semble donc être un facteur d'échange physiologique des Rab3.

III.C.2.d. Fixation des effecteurs et hydrolyse du GTP. Rôle de Rab3GAP

C'est la forme liée au GTP des Rab qui interagit avec ses effecteurs spécifiques par le biais de leur boucle effectrice. De la quantité de Rab:GTP et de la durée de cet état dépend l'intensité du signal qui est transmis en "aval". La liaison des effecteurs de Rab3 sera plus amplement détaillée lors de la présentation de ses effecteurs connus (voir plus loin dans cette partie). La régulation de l'étape d'hydrolyse du GTP par les Rab est donc une étape clé pour la signalisation par ces interrupteurs moléculaires. Les protéines Rab ont une activité d'hydrolyse intrinsèque du GTP très faible. Les protéines GAP (GTPase activating protein) sont capables de stimuler cette activité en se liant, de même que les effecteurs (au sens classique), à la boucle L2 des Rab. Ceci implique que les GAP et les effecteurs des Rab entrent en compétition pour la liaison à ce domaine.

Concernant la famille Rab, seules trois GAP sont identifiées chez les mammifères, Rab3GAP (spécifique des isoformes de Rab3 ; Fukui *et al.*, 1997), GAPCenA, décrite comme la GAP de Rab6, mais qui est également efficace sur Rab2 et 4 (Cuif *et al.*, 1999). La tubérine, le produit d'un gène suppresseur de tumeur, serait la GAP de Rab5 (sans effet sur Rab3 et Rab6 ; Xiao *et al.*, 1997).

De façon intéressante, Rab3GAP ne possède que peu d'homologie avec d'autres GAP décrites, y compris les autres RabGAP. Les différentes GAP semblent contribuer à l'hydrolyse du GTP par les protéines G de différentes manières. Les Ras-GAP et les Rho-GAP agissent sur les régions "switch" des Rab afin de positionner correctement un résidu glutamine important pour l'hydrolyse (Q81 de Rab3a, voir Figure 36) et en apportant également un résidu arginine ("arginine-finger") dans la poche catalytique pour contribuer à la catalyse. Les ARF-GAP stabilisent le switch II, mais ne possèdent pas d'"arginine finger". Dans les protéines G trimériques, ce résidu arginine est déjà contenu dans la sous-unité G_{α} , les protéines RGS (GAP des protéines G trimériques) ne faisant que stabiliser les régions switch.

Les données acquises au laboratoire (Clabecq *et al.*, 2000) montrent que Rab3-GAP catalyserait l'hydrolyse du GTP sur les Rab3 par un mécanisme similaire aux RasGAP/RhoGAP, impliquant un "arginine-finger", et une action sur les régions "switch"

pour permettre l'accès au site catalytique, assez enfoui dans la structure à la différence de Ras, par exemple (voir Figure 36).

On notera enfin que Rab3GAP se purifie sous forme d'un dimère (Fukui *et al.*, 1997), constitué d'une sous-unité portant l'activité catalytique GAP (p130 Rab3GAP, 130 kDa) et d'une sous-unité non catalytique (p150 Rab3GAP, 150 kDa) qui ne modifie pas l'activité GAP de la p130 (Nagano *et al.*, 1998) et dont le rôle physiologique reste inconnu.

La surexpression des formes sauvages des p130 (Oishi *et al.*, 1998; Clabecq *et al.*, 2000) et p150 (Oishi *et al.*, 1998), ainsi que d'une forme mutée de p130 dénuée d'activité catalytique (Aude Clabecq, non publié) dans des cellules PC12 ne modifie pas l'activité sécrétrice. Cela suggère, entre autre, que l'activité GAP n'est pas limitante dans ces cellules.

III.C.2.e. Dissociation de la membrane et terminaison du cycle

La dissociation des Rab des membranes après l'hydrolyse du GTP implique à nouveau RabGDI, qui interagit avec les protéines Rab:GDP, les extrait des membranes, les maintient dans un état soluble dans le cytosol et leur permet ainsi de se réassocier au compartiment donneur pour recommencer un nouveau cycle. Le groupe de Reinhardt Jahn montre que la dissociation de Rab3a et Rab3c des VS est observée lors de la stimulation de la libération dépendant du Ca^{2+} (Fischer von Mollard *et al.*, 1991; Fischer von Mollard *et al.*, 1994), respectivement.

Selon Stahl et coll. (Stahl *et al.*, 1994), l'influx de calcium et la fusion membranaire seraient nécessaires à la dissociation de Rab3 des vésicules ou des granules de sécrétion. En effet, les toxines clostridiales botuliques et tétaniques, qui bloquent l'exocytose inhibent cette dissociation de même que l' α -latrotoxine, qui peut provoquer la fusion indépendamment du Ca^{2+} . Leurs données suggèrent que Rab3 ne se dissocierait des membranes qu'après la fusion complète des membranes. Cependant, les modes d'action de l' α -latrotoxine semblent multiples (voir Figure 43), et il semble avéré que l' α -latrotoxine entraîne une libération de Ca^{2+} depuis des stocks internes (Davletov *et al.*, 1998; Ashton *et al.*, 2001). Cette toxine agirait également en permettant la libération non vésiculaire des neurotransmetteurs en

formant un pore dans la membrane plasmique (Ashton *et al.*, 2000), qui serait perméable aux ions Ca^{2+} (voir par exemple Mironov *et al.*, 1986 ; Liu *et al.*, 1998a ; Ashton *et al.*, 2000).

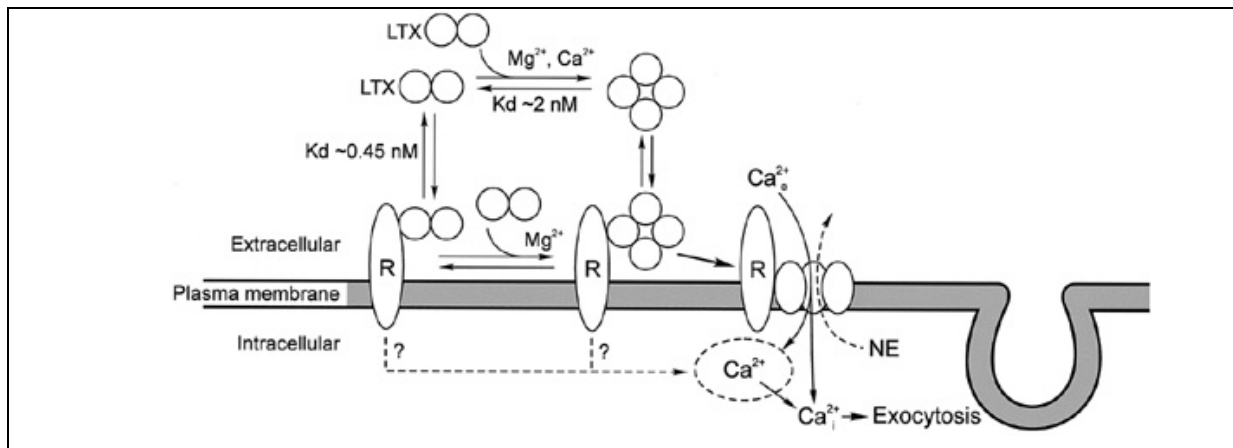


Figure 43

Possibles voies d'action de l' α -latrotoxine pour stimuler la libération d'hormones et de neurotransmetteurs. R = latrophiline, récepteur de α -latrotoxine. Issu de Ashton *et al.*, 2000.

Malgré les observations du groupe de Potter (Slembrouck *et al.*, 1999) qui ont mis en évidence Rab3 sur des compartiments endosomaux dans les cellules chromaffines, on considère généralement que Rab3 est absent de ces membranes, et qu'il est donc dissocié avant ou pendant l'endocytose. Le fait que la Rabphiline, un effecteur de Rab3 se lie à la rabaptine-5 (un effecteur de Rab5) suggère un lien indirect de Rab3 avec les mécanismes d'endocytose. Ceci sera rediscuté lors de la présentation détaillée de la Rabphiline.

III.C.3. Rôle de Rab3 dans la sécrétion régulée

Rab3a a été découverte il y a maintenant 15 ans (Zahraoui *et al.*, 1988). Depuis cette époque, de nombreuses données expérimentales concernant la famille Rab3 (et surtout l'isoforme Rab3a) ont été acquises. S'il est admis que Rab3 joue un rôle important dans la régulation de la libération régulée des hormones et des neurotransmetteurs, force est de constater que le mécanisme d'action de cette GTPase résiste encore à l'analyse. L'identité des étapes du processus d'exocytose contrôlées par Rab3, ainsi que la nature et le rôle de ses partenaires, sont des sujets de discussions, voire de controverses.

Le point (délicat) de départ est l'effet de Rab3 sur la sécrétion régulée. Même si la réponse semble *a priori* être ternaire (stimulateur, neutre, inhibiteur) dans un système

expérimental donné, on va voir dans ce qui suit que les conclusions peuvent différer selon les modèles choisis.

Lorsque j'ai démarré ma thèse au sein de l'équipe de François Darchen, un consensus semblait accorder un rôle *plutôt* inhibiteur aux Rab3. Cela doit être nuancé, cet aspect semblant dépendre du contexte cellulaire (présence de jeux d'effecteurs particuliers, par exemple).

Dans la partie qui suit, j'ai tenté de dresser un bilan des effets des Rab3 rapportés dans la littérature, en illustrant certains points autour desquels peuvent se dégager des consensus, mais aussi des polémiques (voir texte et Tableaux 5 à 9). Je précise que ce survol ne vise pas à l'exhaustivité, qui, en tout état de cause, semble difficile à atteindre dans le cas de Rab3 ; les Rab3 tiennent le haut du pavé des Rab en terme de citations dans PubMed (~220 entrées en "titre", isoformes confondues, et plus de 500 y font référence dans leur résumé), loin devant Rab5 (139 "titres"), Rab2 (55 "titres") ou bien Rab6 et Rab11 (49 "titres" chacune).

Dans cette masse d'information, c'est l'isoforme 3A la plus documentée (>50% des publications sur cette famille) ; c'est donc essentiellement sur cette isoforme que je me concentrerai dans ce qui suit.

Tableau 5 : Etude de Rab3a dans différents systèmes

	Forme :		Effet :	Modèle :	Mesure :	Référence :
Rab3a	Rab3AQ81L	transfection	↓ sécrétion	Cell. chromaffines	hGH	(Holz <i>et al.</i> , 1994)6]
	Rab3AQ81L	injection	↓ sécrétion	Cell. chromaffines	Capa. membranaire	(Johannes <i>et al.</i> , 1994)7]
	Rab3AQ81L	transfection	↓ sécrétion	PC12	Sécrétion DBH	(Johannes <i>et al.</i> , 1994)7]
	Antisens αRab3A	injection	↑ sécrétion ↑ sécrétion (stim. répétées)	Cellules chromaffines	Capa. membranaire	(Johannes <i>et al.</i> , 1994)7]
	Rab3AQ81L	transfection	↓ sécrétion	HIT-T15	hGH	(Regazzi <i>et al.</i> , 1996)8]
	Rab3AQ81L	Clone stable	↓ sécrétion	PC12	[³ H]NE	(Weber <i>et al.</i> , 1996)6]
	Rab3AQ80L	injection	↓ sécrétion ↑ délai d'action Tox. Clost.	Aplysie	Electrophysiologie (Lib. ACh)	(Johannes <i>et al.</i> , 1996)1]
	Rab3A:GTP	Perfusion	↓ sécrétion ↓ quanta	Cellules chromaffines	Ampérométrie	(Lin <i>et al.</i> , 1996)1]
	apRab3aQ80L	injection	↓ sécrétion ↑ PPF ↑ Facilit. train. →PTP	Aplysie	Electrophysiologie (Lib. ACh)	(Doussau <i>et al.</i> , 1998)2]
	Rab3Q81L (A,B,C et D)	transfection	↓ sécrétion	PC12 cellules chromaffines	hGH	(Chung <i>et al.</i> , 1999)3]
	Rab3Q81L (A,B,C et D)	transfection	↓ sécrétion	HIT-T15 PC12	Insuline hGH	(Iezzi <i>et al.</i> , 1999)9]
	Rab3AWT	Clone stable	↑ nombre de granules (total et arrimés)	PC12	MET ;comptage granules	(Martelli <i>et al.</i> , 2000)0]
	Rab3AQ81L	transfection	↓ sécrétion	STC-1 (lignée entérochromaffine intestinale)	hGH	(Gevrey <i>et al.</i> , 2001)3]
	Rab3aWT	transfection	→/↑ sécrétion (ctrl/Heregulin β)	MCF-7 (lignée de cellules mammaires humaines)	hGH	(Vadlamudi <i>et al.</i> , 2000)2]
	Rab3A:GTP	Ajout protéine recombinante	↑ sécrétion	Spermatozoïde	Réaction acrosomique	(Yunes <i>et al.</i> , 2000)4] (Michaut <i>et al.</i> , 2000)5] (De Blas <i>et al.</i> , 2002)6]
Rab3AWT (Rab3b,c,d WT sans effet)	transfection	↓ sécrétion	ARJ-42 (Lignée pancréatique)	Sécrétion d'amylase	(Piiper <i>et al.</i> , 2001)3]	
KO Rab3a	KO Rab3A	KO	↑ dépression synaptique →PPF(CA1) → LTP	Neurons d'hippocampe (CA1, stratum radiatum)	Electrophysiologie	(Geppert <i>et al.</i> , 1994a)1]
	KO Rab3A	KO	↑ sécrétion ↑ PPF(CA1) → n → RRP → P	Neurons pyramidaux d'hippocampe (culture)	Electrophysiologie	(Geppert <i>et al.</i> , 1997)9]
	KO Rab3	KO	↓ VS à la zone active ↓ sécrétion	C. elegans	Electrophysiologie	(Nonet <i>et al.</i> , 1997)8]
	KO Rab3A	KO	↓ mflTTP → FF (freq facilit) → PPF → P (sugg.)	Mf CA3 (hippocampe, stratum lucidum)	Electrophysiologie	(Castillo <i>et al.</i> , 1997)4]
	KO Rab3a	KO	↑ sécrétion	Synaptosomes (hippocampe) (Mf CA3)	[³ H]glutamate	(Lonart <i>et al.</i> , 1998a)5]
	KO Rab3A	KO	↓ transport VS (stimulations répétées)	Synaptosomes cerveau rat	MET, libération GABA et Glutamate	(Leenders <i>et al.</i> , 2001)4]
	KO Rab3A	KO	→ dépression synaptique	Neurons d'hippocampe	Electrophysiologie	(Castillo <i>et al.</i> , 2002)3]

Tableau 6 : Etude de Rab3a dans différents systèmes

Rab3a - peptides	Pept. dom. Eff. Rab3A	Ajout peptide	↓ sécrétion	Spermatozoïde	Réaction acrosomique	(Iida <i>et al.</i> , 1999)3]
	Peptide dom. Eff. Rab3 ou anticorps	Injection	↓ sécrétion	Embryon d'oursin	Division cellulaire	(Conner <i>et al.</i> , 2000)8]
	Pept. dom. Eff. Rab3A	Ajout peptide	↑ sécrétion	Acini pancréatiques	Sécrétion d'amylase	(Padfield <i>et al.</i> , 1992)9]
	Pept. dom. Eff. Rab3A	Ajout peptide	↑ sécrétion	Mastocytes	Capacitance membranaire	(Oberhauser <i>et al.</i> , 1992)0]
	Pept. dom. Eff. Rab3A	Ajout peptide	↑ sécrétion	HIT-T15	Sécrétion d'insuline	(Li <i>et al.</i> , 1993)6]
	Pept. dom. Eff. Rab3A	Ajout peptide	↑ sécrétion	Mastocytes	β hexosaminidase	(Law <i>et al.</i> , 1993)7]
	Pept. dom. Eff. Rab3A	Ajout peptide	↑ sécrétion	Cellules GH3 de l'hypophyse	Electrophysiologie	(Suzuki <i>et al.</i> , 1997)8]
	Pept. dom. Eff. Rab3A	Ajout peptide	↑ sécrétion	Cellules chefs de l'estomac	Sécrétion de pepsinogène	(Singh <i>et al.</i> , 1995)1]

Tableau 7 : Etude de Rab3b dans différents systèmes

Rab3b	Antisens αRab3B	injection	↓ sécrétion	Antéhypoph.	Capacité membranaire	(Lledo <i>et al.</i> , 1993)
	Rab3BWT	Clone stable	↑ pseudopod.	PC12	Morphologie	(Sunshine <i>et al.</i> , 2000)
	Rab3BWT et Rab3BN135I	Clones stables	↑ sécrétion	PC12	[³ H]NE	(Weber <i>et al.</i> , 1996)
	Rab3BQ81L	transfection	↓ transcytose	MDCK	Transcytose de IgA dimérique	(van <i>et al.</i> , 2002)
	Antisens αRab3B	transfection	↓ sécrétion	Antéhypoph. (gonadotropes)	Sécrétion de gonadotrophines (pop. Et cell. Unique)	(Tasaka <i>et al.</i> , 1998)
	Peptide Ct de Rab3A et B	injection	↓ sécrétion	Antéhypoph.	Sécrétion de prolactine	(Perez <i>et al.</i> , 1994)
	Rab3BQ81L	transfection	↓ sécrétion	PC12 Cell. chromaffines	hGH	(Chung <i>et al.</i> , 1999)

Tableau 8 : Etudes de Rab3c dans différents systèmes

Rab3c	Rab3CQ81L	transfection	↓ sécrétion	PC12 Cell. Chromaffines	hGH	(Chung <i>et al.</i> , 1999)
	Rab3CQ81L	transfection	↓ sécrétion	HIT-T15 PC12	Insuline hGH	(Iezzi <i>et al.</i> , 1999)

Tableau 9 : Etude de Rab3d dans différents systèmes

Rab3d	KO Rab3D	KO	↑ taille granules.	Glande parotide, pancréas exocrine	MET	(Riedel <i>et al.</i> , 2002)
	Surexpression Rab3D WT	Souris transgénique	↑ sécrétion	Pancréas exocrine	Sécrétion d'amylase	(Ohnishi <i>et al.</i> , 1997)
	Rab3DT36N Rab3D N135I Rab3DQ81L	transfection	↓ sécrétion ↓ sécrétion Pas d'effet	Cellules pancréatiques	Sécrétion d'amylase	(Chen <i>et al.</i> , 2002)
	Rab3DQ81L	transfection	↓ sécrétion	Mastocytes (RBL-2H3)	β hexosaminidase	(Roa <i>et al.</i> , 1997)
	Rab3DQ81L	transfection	↓ sécrétion	PC12 Cell. Chromaffines	hGH	(Chung <i>et al.</i> , 1999)
	Rab3DWT	Clones stables	↑ nbre granules total et dockés	PC12	MET ; comptage granules	(Martelli <i>et al.</i> , 2000)
	Rab3DWT Rab3DN135I	Clone stable	Pas d'effet ↓ sécrétion ↓ GS à la MP	AtT-20	Libération ACTH	(Baldini <i>et al.</i> , 1998)

III.C.3.a. Quelques arguments en faveur d'un rôle inhibiteur de Rab3

Les effets de la surexpression, ou bien de l'injection, de la forme mutante incapable d'hydrolyser le GTP de Rab3 (Rab3aQ81L) ont été étudiés dans de nombreux systèmes cellulaires.

Les cellules chromaffines de la médullosurrénale bovine ont été un des premiers systèmes utilisés pour caractériser les effets de Rab3 sur la sécrétion. La forme Rab3a:GTP inhibe la sécrétion de hGH dans ces cellules, intactes ou perméabilisées (Holz *et al.*, 1994). La micro-injection de la protéine mutante produit les mêmes effets sur la sécrétion suivie par mesure de capacité membranaire (Johannes *et al.*, 1994). Des résultats concordants sont produits par Lin *et al.*, 1996 dans des chromaffines bovines perfusées par Rab3a:GTP (et plus encore par Rab3a:GTP γ S, un analogue non hydrolysable du GTP) via la pipette de patch, stimulées par des dépolarisations électriques et dont l'activité est mesurée par détection ampérométrique des catécholamines libérées. On notera que dans cette étude, Rab3a:GTP induit une légère baisse de la quantité de catécholamines libérées par événement ; ceci peut être interprété de plusieurs manières : soit Rab3a module l'ouverture du pore de fusion et provoque la libération incomplète du contenu granulaire, soit augmente la probabilité de fusion de petites vésicules, soit inhibe la fusion homotypique de granules qui précède l'exocytose (Riedel *et al.*, 2002), ou enfin abaisserait l'activité de VMAT.

Toujours dans ce système cellulaire, la diminution du niveau de Rab3a endogène par une stratégie d'injection d'oligonucléotides antisens aboutit aux effets symétriques "prévisibles", soit une augmentation de l'exocytose, avec une facilitation marquée lors de stimulations successives (Johannes *et al.*, 1994).

D'autres études, menées sur le neurone cholinergique du ganglion buccal d'aplysie, conduisent à la même conclusion : l'injection de la protéine recombinante chimérique humaine/aplysie (hu/apRab3aQ81L) ou de la protéine d'aplysie (apRab3Q80L) inhibe rapidement la libération d'ACh (-50 %, 1 heure après l'injection ; Johannes *et al.*, 1996). Ceci va dans le sens d'un développement rapide de l'effet inhibiteur de Rab3 sur l'exocytose (effet visible après quelques minutes), en accord avec les observations de (Lin *et al.*, 1996), où l'effet se développe rapidement après l'introduction de la protéine mutante via la pipette de patch.

En revanche, ces mêmes mutants tronqués de quelques acides aminés à leur extrémité carboxyterminale (ΔC , donc non isoprénylés) perdent leur effet sur la sécrétion. On notera que les formes mutantes V55E et V55E/Q81L stimulent légèrement la sécrétion d'ACh (Johannes *et al.*, 1996).

III.C.3.b. Apport des KO de Rab3

La réalisation d'animaux transgéniques dont le gène codant Rab3a a été inactivé par recombinaison homologe (désigné ci-après par KO Rab3a) a permis de faire progresser sensiblement la compréhension du rôle de Rab3 dans l'exocytose. De manière assez surprenante, les souris déficientes pour Rab3a sont viables et fertiles. Les études menées par le groupe de Thomas Südhof montrent que la plupart des paramètres électrophysiologiques des cellules pyramidales de la couche CA1 de l'hippocampe de ces animaux sont normaux (Geppert *et al.*, 1994a). Le fait le plus marquant est l'augmentation de la dépression synaptique, induite à l'aide de courts trains de potentiels, indiquant une altération du renouvellement du pool libérable de VS.

Les études plus récentes menées par ce groupe montrent que la fréquence et la taille des événements spontanés miniatures n'est pas modifiée, pas plus que la taille du pool de VS libérables, estimée par l'application d'une solution hyperosmotique de saccharose (un processus indépendant du Ca^{2+} ; Geppert *et al.*, 1997). En revanche, la stimulation électrique des neurones induit une augmentation du nombre moyen de quanta libérés par terminaison (+100%). De plus, une forme de mémoire à court terme dépendant de la rémanence calcique, la PPF (Paired-Pulse Facilitation, i.e. facilitation d'une réponse test évaluée après un premier choc conditionnant) est augmentée chez les animaux KO Rab3a. Les auteurs concluent à une absence de modification de P , en même temps que de n (le pool libérable, déterminé par application de saccharose hypertonique). Ceci pose un problème, dans la mesure où la sécrétion est augmentée. Une possibilité serait que q (la taille quantique) soit modifiée, ou bien que n soit augmenté, mais que cela soit masqué par la saturation des récepteurs post-synaptiques (Geppert *et al.*, 1997). Néanmoins, la conclusion serait un rôle inhibiteur de Rab3a sur la sécrétion.

La LTP (Long-Term Potentiation, ou potentialisation à long terme) est une forme de "mémoire", très différente de la PPF dans ses mécanismes (qui implique la rémanence

calcique, à l'échelle de la dizaine de ms). Il existe en fait au moins deux formes distinctes de LTP dans l'hippocampe. Une LTP d'origine post-synaptique dans la région CA1, faisant intervenir l'activation des récepteurs NMDA, et une forme pré-synaptique dans la région CA3, impliquant l'AMPC et la PKA, et la phosphorylation probable de nombreuses cibles. Les fibres moussues de la couche CA3 de l'hippocampe constituent un modèle privilégié pour l'étude de cette forme de plasticité, alors dénommée mfLTP (mossy fiber LTP), et qui s'étend sur des échelles de temps allant d'une à plusieurs dizaines de minutes.

Castillo et coll. rapporte une forte altération de la mfLTP chez les animaux déficients en Rab3a (Castillo *et al.*, 1997) ; on notera que, dans ce système, la PPF et l'habituation à la fréquence (une autre forme de plasticité à court terme) ne sont pas affectées, contrairement aux observations de Geppert *et al.*, 1997 dans des neurones de la région CA1. Les données biochimiques obtenues sur des préparations de synaptosomes (couche CA3) issus de cerveaux d'animaux KO pour Rab3a confirment l'implication de Rab3a dans un phénomène dépendant de l'AMPC (i.e. mfLTP ; Lonart *et al.*, 1998a).

Les effets relativement subtils de l'inactivation de Rab3a chez la souris sont troublants ; on voit que Rab3a n'est pas un acteur essentiel de la libération, en ce sens que le développement et le fonctionnement cérébral sont globalement normaux chez les animaux KO, et que des événements d'exocytose sont toujours présents (et même plus fréquents) ; au niveau de l'organe entier, la compensation par d'autres isoformes de Rab3 (Rab3b ou c, Rab3d n'étant pas exprimée dans le cerveau) ou peut-être même par d'autres Rab est possible.

De façon inattendue, lors d'un crible de lignées de souris présentant des dérégulations du rythme circadien, Kapfhamer et coll. ont isolé des mutations de Rab3a conduisant à l'absence quasi-totale de la protéine (Kapfhamer *et al.*, 2002). Les troubles observés chez ces mutants (*earlybird*, raccourcissement du rythme circadien et perturbations de la réponse à la privation de sommeil) sont retrouvés chez les animaux KO pour Rab3a. Ils constituent le seul phénotype apparent des animaux déficients en Rab3a, en marge des phénotypes électrophysiologiques subtils évoqués précédemment.

III.C.3.c. Quelques arguments pour un rôle stimulateur de Rab3

III.C.3.c.i. Le KO de Rab3 chez *C. elegans*

Un seul gène codant Rab3 est trouvé chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. De fait, le phénotype observé chez les vers dépourvus de Rab3 est plus marqué que chez la souris, mais reste modéré (Nonet *et al.*, 1997). Quelques défauts locomoteurs les distinguent des animaux contrôles. Au niveau électrophysiologique, l'activité de motoneurons impliqués dans la contraction des muscles du pharynx montre des modifications de l'amplitude, de la fréquence et du synchronisme des événements. Ces résultats suggèrent un effet "positif" de Rab3 sur l'exocytose, contrairement aux données issues des études du KO chez la souris.

Au niveau ultrastructural, les synapses d'animaux mutants sont fortement appauvries en VS (2 à 3 fois moins que le sauvage) présentes à la zone active, tandis que leur nombre dans les régions latérales distantes de la zone active est fortement augmenté (>5 fois). Si la quantité totale de VS par terminaison n'est pas affectée, leur distribution fonctionnelle est fortement perturbée.

Ces données sont en accord avec les observations fonctionnelles de Geppert *et al.*, 1994a, suggérant une diminution du recrutement des VS. Ces données peuvent suggérer un rôle de Rab3 dans une étape d'arrimage des VS à la membrane plasmique, ou dans une étape de transport y menant. C'est cette hypothèse qu'ont testé Leenders *et coll.* chez des souris déficientes en Rab3a (Leenders *et al.*, 2001). Il ressort de cette analyse que le défaut en Rab3a n'affecte pas le nombre total de VS présentes dans la terminaison (synaptosomes reconstitués) au repos comme après une stimulation, mais que celles-ci y sont redistribuées différemment, en accord avec les données de Nonet *et al.*, 1997. Chez les animaux sauvages, la stimulation de l'exocytose augmente le nombre de VS morphologiquement amarrées à la zone active. L'élimination de Rab3a empêche ce processus. De même, le réapprovisionnement de la terminaison en VS compétentes après une stimulation massive est fortement affecté au cours d'une stimulation test, effectuée 10 ou 30 minutes plus tard (Leenders *et al.*, 2001). De façon étonnante, ce défaut n'est plus visible si la déplétion du pool de VS est réalisée par l'application d'une solution hyperosmotique de saccharose, un procédé indépendant des ions Ca^{2+} extracellulaire, mais dont le mécanisme d'action reste inconnu (Rosenmund *et al.*, 1996).

III.C.3.c.ii. Rab3a et réaction acrosomique

Rab3a est présent à la surface de l'acrosome, une vésicule sécrétrice de grande taille contenant des enzymes hydrolytiques permettant au spermatozoïde de pénétrer l'enveloppe externe de l'ovule (Iida *et al.*, 1999). Au cours de la fécondation, le contact du spermatozoïde avec l'ovule entraîne la fusion de l'acrosome avec la membrane plasmique au cours de la réaction acrosomique, suivi d'une polymérisation explosive d'actine qui projette le contenu de l'acrosome au travers de la membrane externe de l'ovule.

Une première observation concernant la stimulation de la réaction acrosomique par un peptide mimant le domaine effecteur de Rab3 (Garde *et al.*, 1996) suggérait un effet stimulateur de Rab3 sur cette réaction. Cependant, s'il est vrai que de telles observations ont également été rapportées dans de nombreux autres systèmes cellulaires (Oberhauser *et al.*, 1992; Padfield *et al.*, 1992; Law *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 1995; Suzuki *et al.*, 1997), ces données doivent être observées avec prudence. En effet, la surexpression dans ces mêmes systèmes cellulaires de la forme Rab3:GTP s'accompagne d'une inhibition de la sécrétion. Ceci suggère que les effets stimulateurs de ces peptides sont dus à une titration improductive des effecteurs cellulaires de Rab3.

Cependant, dans ce cas particulier, la réaction acrosomique est stimulée par l'ajout de Rab3a:GTP (Michaut *et al.*, 2000; Yunes *et al.*, 2000; De Blas *et al.*, 2002; Yunes *et al.*, 2002), et cette stimulation est abolie en présence de Rab-GDI (Michaut *et al.*, 2000; Yunes *et al.*, 2000). Il semble donc, *a priori*, que l'effet de Rab3a:GTP dans cette étude ne soit pas dû à une titration des effecteurs. Le travail effectué par ce groupe amène également d'intéressantes considérations sur les relations entre Rab3 et les stocks de Ca²⁺ intracellulaires, qui seront détaillées plus loin.

Dans le cas de Rab3b, il a également été rapporté une baisse d'activité sécrétrice consécutive à la diminution de cette isoforme (par injection d'oligonucléotides antisens dans des neurones de l'antéhypophyse ; Lledo *et al.*, 1993). Des résultats similaires ont été obtenus dans les cellules gonadotropes de l'antéhypophyse, avec une approche expérimentale différente (Tasaka *et al.*, 1998).

D'autres exemples d'un rôle stimulateur de Rab3:GTP sur l'exocytose sont fournis par des études menées sur l'isoforme Rab3d. Ainsi, le mutant Rab3dT36N (Rab3D:GDP) entraîne une inhibition de la sécrétion d'amylase dans les cellules acinaires pancréatiques (avec une inhibition variable au cours du temps -71%/5 minutes, puis -36%/ 30 minutes ; Chen *et al.*, 2002).

À l'inverse, le mutant Rab3dQ81L n'a pas d'effet dans cette étude, ce qui est plutôt étonnant car une stimulation de la sécrétion pourrait être attendu. En effet, il a été démontré précédemment que la sécrétion d'amylase était fortement augmentée chez des animaux surexprimant Rab3d (de 160 à 210% d'augmentation, selon le sécrétagogue choisi (Ohnishi *et al.*, 1997)).

III.C.3.d. Rab3 et sensibilité au Ca^{2+} de la réponse sécrétrice

L'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ est le signal déclenchant la sécrétion régulée des hormones et des neurotransmetteurs. L'ensemble des étapes liant le Ca^{2+} au déclenchement de la sécrétion est imparfaitement connu. Rab3, de par sa fonction et sa localisation, se trouve dans un domaine susceptible d'éprouver de fortes et rapides variations de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} . Ainsi les travaux menés au laboratoire en collaboration avec Pierre-Marie Lledo (Gif s/Yvette) et l'équipe de Bernard Poulain (Strasbourg) montrent que Rab3 intervient probablement après l'arrimage des vésicules synaptiques au niveau des sites de libération (Johannes *et al.*, 1996), et que l'injection d'oligonucléotides antisens dirigés contre Rab3a dans les cellules chromaffines augmente très significativement la sensibilité de l'exocytose au calcium (Johannes *et al.*, 1998). De plus, Rab3:GTP modifie certaines formes de plasticité synaptique dans le neurone cholinergique du ganglion buccal de l'aplysie. En particulier, l'effet inhibiteur de apRab3aQ80L est levé dans des protocoles de PPF ou de facilitation de train (Doussau *et al.*, 1998). Inversement, la chélation du Ca^{2+} intracellulaire potentialise fortement l'effet lié à l'injection de la protéine mutante, indiquant un fort effet inhibiteur pour de faibles valeurs de $[Ca^{2+}]_i$.

Les résultats issus de l'analyse des souris déficientes en Rab3a, en particulier la perturbation de la PPF dans les neurones CA1 de l'hippocampe, indiquent également une implication probable de Rab3 dans les mécanismes liés à la sensibilité au Ca^{2+} de l'exocytose. De plus, l'interaction de Rab3 avec des effecteurs identifiés comme capable de lier le Ca^{2+} (comme la Rabphiline, voir chapitre suivant) renforce cette possibilité.

III.C.3.e. Rab3 et le complexe SNARE

Comme on l'a vu, les SNARE sont des acteurs essentiels du mécanisme d'exocytose. Chez la levure, organisme modèle pour l'étude de la régulation du trafic vésiculaire, des liens fonctionnels entre SNARE et Rab ont pu être mis en évidence. Par exemple, il est rapporté que des mutations de protéines SNAREs peuvent agir comme des suppresseurs de mutations des Rab.

Dans leur étude, Brennwald et coll. démontrent en effet que la surexpression de Sec9p, un homologue de SNAP-25 chez la levure, aboutit à la suppression du phénotype associé à une mutation du domaine effecteur de Sec4p, une protéine de type Rab impliquée dans le trafic vésiculaire entre le réseau golgien et la membrane cellulaire. Néanmoins, les auteurs n'ont pas trouvé d'association physique entre Sec9p et Sec4p (Brennwald *et al.*, 1994). Ceci est à rapprocher de la suppression du phénotype associé à la perte de fonction de Ypt1p (une Rab impliquée dans le trafic RER→Golgi) par la surexpression de Sly2p (homologue à la VAMP ; Dascher *et al.*, 1991), ou par la surexpression simultanée de Sec22p et Bos1p (deux tSNAREs de levure ; Lian *et al.*, 1994).

En plus de ces compensations fonctionnelles, la démonstration d'une interaction physique directe entre Rabs et SNAREs a été faite dans le cas de Ypt1p et Sed5p (tSNARE ; Lupashin *et al.*, 1997). Ces résultats, obtenus par études d'une souche doublement mutante pour Sec18p (NSF) et Ypt1p (Rab) démontrent que l'association du complexe v/t-SNARE est Ypt1p dépendante, et que l'association de Ypt1p/Sed5p est transitoire. Cependant, si le groupe de Peter Novick a pu mettre en évidence d'autres interactions Rab/SNARE chez la levure, ces interactions ne semblent pas physiologiquement significatives (Grote *et al.*, 1999), car elles sont possibles avec les formes libres des Rab (i.e. sans nucléotide lié, sans doute instables ou dénaturées).

Un autre exemple, particulièrement intéressant ici puisqu'il implique Rab3, est la relation fonctionnelle qui a pu être établie entre Rab3 et les SNAREs dans le neurone cholinergique de l'aplysie (Johannes *et al.*, 1996). Dans ce système, l'injection préalable de la forme mutante dénuée d'activité d'hydrolyse du GTP retarde l'action inhibitrice des toxines tétaniques et botuliques. Cette "protection" des SNAREs vis-à-vis de l'attaque

protéolytique des toxines clostridiales suggérerait une action inhibitrice de Rab3aQ81L en aval de la formation du complexe SNARE en *trans*. En effet, des expériences biochimiques indiquent que le complexe est résistant à l'action des toxines (Hayashi *et al.*, 1994). En toute rigueur, il faut indiquer que le complexe *cis* est insensible aux toxines mais qu'on ne connaît pas avec certitude la sensibilité du complexe en *trans*.

III.C.3.f. Autres aspects du rôle des Rab3

Récemment, il a été démontré que les granules contenus dans les cellules du pancréas exocrine, ainsi que ceux des cellules de la glande parotide d'animaux KO pour Rab3D sont en moyenne 2 fois plus grands que ceux d'animaux normaux, suggérant un rôle de Rab3D dans le contrôle de la fusion homotypique de ces organelles (Riedel *et al.*, 2002).

III.C.3.g. Conclusion – Quel rôle pour Rab3 ?

On voit que, globalement, l'ensemble de la littérature suggère un rôle inhibiteur pour Rab3a:GTP dans un grand nombre de modèles cellulaires et avec des approches variées. Le peu de données fonctionnelles disponibles sur Rab3c vont également dans ce sens. La contradiction (i.e. un rôle positif de Rab3a dans l'exocytose) est néanmoins apportée par plusieurs études, comme dans le cas du KO chez le nématode et la fusion acrosomique, qui sont peut-être des cas particuliers.

Cependant, même au sein des études concluant à un effet inhibiteur de Rab3a:GTP, il est difficile de dégager un rôle clair pour Rab3a. Certaines conclusions semblent s'appliquer à certains modèles, mais pas à tous. Il ressort que Rab3 agit vraisemblablement à plusieurs niveaux du cycle vésiculaire, comme le transport des VS, l'arrimage, la maturation et la sensibilité au Ca²⁺. Selon le contexte cellulaire (nature et abondance des effecteurs) et la méthode adoptée, l'accent est mis sur l'une des facettes de l'activité de la cette protéine.

Ainsi, les études morphologiques réalisées dans des cellules PC12 exprimant Rab3aWT (Martelli *et al.*, 2000) ou dans les animaux KO pour Rab3 (Nonet *et al.*, 1997; Leenders *et al.*, 2001) indiquent un rôle de Rab3 plutôt positif dans le processus de recrutement des VS à la membrane plasmique.

D'autres données soulignent un rôle potentiel de Rab3 dans les étapes finales impliquant la sensibilité au Ca^{2+} de l'exocytose, sans que le mécanisme d'action de Rab3 à ce niveau soit clair (Geppert *et al.*, 1997; Doussau *et al.*, 1998; Johannes *et al.*, 1998).

III.C.4. Effecteurs connus de Rab3

La diversité des effets de Rab3 sur la sécrétion régulée des hormones et des NT implique donc vraisemblablement plusieurs effecteurs. Plusieurs ligands de Rab3 ont été identifiés. Dans cette partie sont résumés les résultats obtenus sur ces protéines, leur rôle dans la sécrétion et leur lien fonctionnel avec Rab3.

III.C.4.a. La Rabphiline

La Rabphiline (710 acides aminés, masse apparente 86 kDa) a été identifiée par une approche de réticulation à Rab3 dans des extraits de cerveaux bovins (Shirataki *et al.*, 1992). Elle lie préférentiellement la forme Rab3:GTP, avec une très bonne affinité, de l'ordre de 10 à 20 nM (Shirataki *et al.*, 1993) qui en fait l'effecteur le plus affiné de Rab3. C'est une protéine soluble, mais qui est également détectée sur la membrane des vésicules synaptiques (Mizoguchi *et al.*, 1994 ; Chung *et al.*, 1995).

III.C.4.a.i. La Rabphiline comporte trois domaines fonctionnels

Elle peut, sur des bases structurales et fonctionnelles, être divisée en 3 domaines distincts.

Le segment N-terminal est essentiellement constitué d'un domaine de liaison à Rab3 (aminoacides 45-161). Celui-ci contient une hélice α et deux motifs dits en "doigts à zinc" chélatant chacun un ion Zn^{2+} (région 90 à 140). Ce domaine est important (mais non suffisant) pour la liaison à Rab3, sa délétion déstabilisant la protéine *in vivo* et abolit sa liaison à Rab3 (McKiernan *et al.*, 1996; Chung *et al.*, 1997).

Son domaine central (acides aminés 190-400) comprend deux régions riches en prolines, qui contribueraient à la liaison de la Rabphiline aux membranes ainsi que des sites de phosphorylation par la PKA, la Calmoduline kinase II et la PKC (Kato *et al.*, 1994; Fykse *et al.*, 1995; Fykse, 1998) ; la phosphorylation de ces sites semble revêtir une certaine

importance fonctionnelle, dans la mesure où celle-ci augmente lors de la stimulation de l'exocytose (Fykse, 1998; Lonart *et al.*, 1998b). Plus récemment, il a été montré que la phosphorylation de 2 sérines de ce domaine central (Ser 234 et Ser 274) dépendait de façon étroite de la présence de Rab3 et du Ca^{2+} et que la phospho-Rabphiline semblait liée de manière plus labile aux membranes des vésicules synaptiques (Foletti *et al.*, 2001). Par ailleurs, il semblerait que la phosphorylation de la Rabphiline n'affecte pas sa liaison avec Rab3 (Kato *et al.*, 1994; Numata *et al.*, 1994), du moins *in vitro*.

Le rôle de ces phosphorylations est encore largement inconnu. Il est possible que celles-ci affectent l'affinité de la Rabphiline pour Rab3 *in vivo*, ou bien qu'elles aient des répercussions sur la liaison de la Rabphiline aux membranes par le biais de ses domaines C2, présents dans son extrémité carboxyterminale et analogues à ceux de la synaptotagmine. Ces domaines C2, qui représentent le troisième domaine fonctionnel, lient les phospholipides acides (phosphatidylsérine et phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) de manière dépendante du calcium (Chung *et al.*, 1998). Même en absence de phospholipides, une liaison du calcium sur le domaine C2B a été observée (Ubach *et al.*, 1999).

III.C.4.a.ii. Interaction Rab3/Rabphiline ; données cristallographiques

La structure du co-complexe Rab3a/Rabphiline a été résolue (Ostermeier *et al.*, 1999).

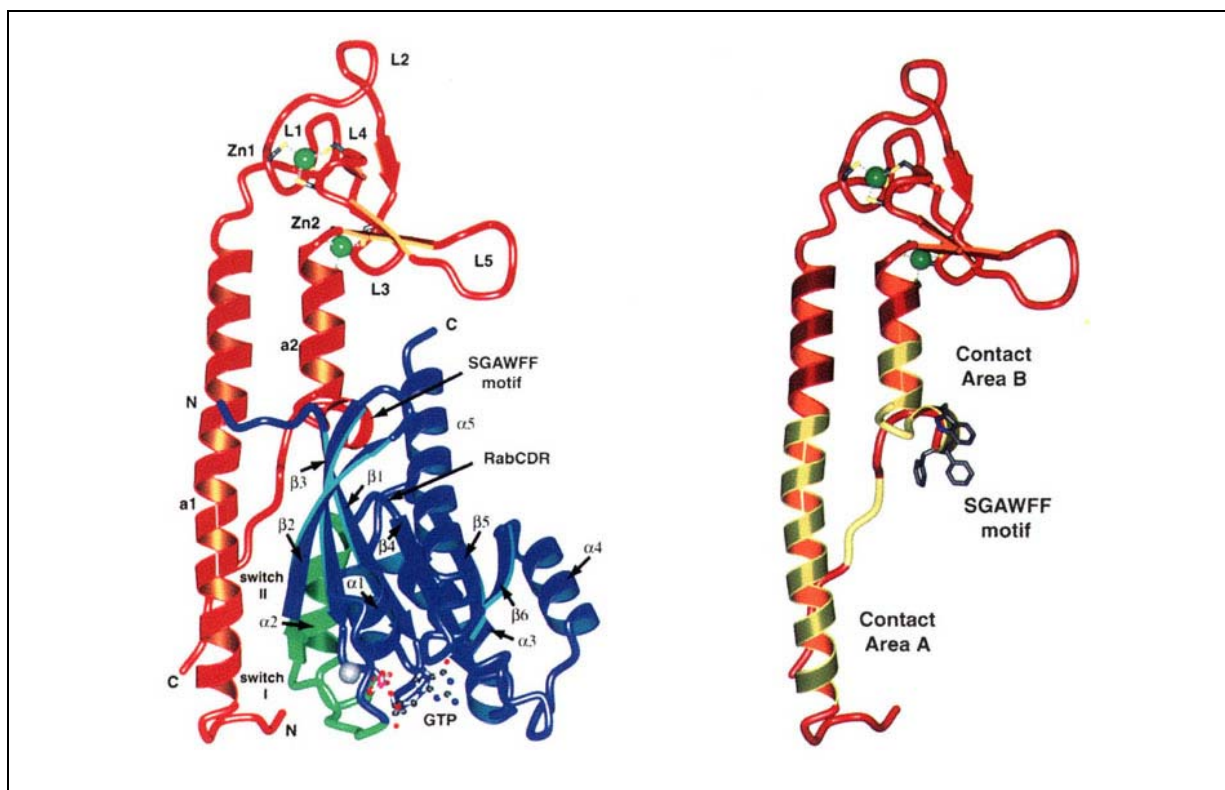


Figure 44

Structure du complexe Rab3a/Rabphiline. **Panneau gauche** : modèle en ruban de l'interaction entre Rab3 (en bleu) et la Rabphiline (rouge). Les régions switch I et II de Rab3 sont représentées en vert. Noter que seul le fragment correspondant aux aminoacides 40 à 170 de la Rabphiline (comprenant la première hélice α (a1), les 2 motifs en doigt à zinc (Zn1 et Zn2), la seconde hélice α (a2) et le motif SGAWFF) a été résolu. Ce fragment contient le motif minimal d'interaction à Rab3 (aa 45 à 161) et a été choisi pour faciliter l'obtention de co-cristaux. Il exclut le domaine central et les domaines C2 carboxyterminaux. **Panneau droit** : Structure de la Rabphiline seule ; les parties en interaction directe avec Rab3 sont représentées en jaune. On distingue 2 régions principales de contact : les 2 premiers tiers de $\alpha 1$ (région A) et la moitié de $\alpha 2$, ainsi que le motif SGAWFF (région B). Tiré de Ostermeier *et al.*, 1999.

Cette structure confirme que les régions "switch" de Rab3, qui changent de conformation selon la nature du nucléotide lié, interagissent avec l'hélice α N-terminale de la Rabphiline (voir Figure 44). Mais, en plus de ces régions "switch" (qui sont assez bien conservées entre toutes les protéines Rab), de nouvelles zones d'interaction ont été identifiées; elles sont nommées RabCDR pour Complementary Determining Regions. Ces RabCDR interagissent notamment avec le motif "SGAWFF" de la Rabphiline. Ce motif est présent dans la Rabphiline de différentes espèces, chez RIM et Noc2. Un motif proche (SLEWFFY) est

présent dans d'autres effecteurs de protéines Rab, comme MyRIP (voir plus loin dans ce chapitre). On trouve donc ce motif hydrophobe dans la séquence de la plupart des effecteurs de Rab3. À l'inverse, les motifs RabCDR des isoformes de Rab3 sont très proches les uns des autres, mais assez variables entre les différentes familles de Rab, suggérant qu'ils pourraient être responsables de la spécificité de l'interaction entre les protéines Rab et leurs ligands.

III.C.4.a.iii. Expression et localisation subcellulaire de la Rabphiline

L'expression de la Rabphiline est spécifique des cellules sécrétrices (Inagaki *et al.*, 1994). Dans les neurones, la Rabphiline est exclusivement localisée dans les terminaisons présynaptiques, où elle s'associe aux vésicules synaptiques (Li *et al.*, 1994a ; Mizoguchi *et al.*, 1994).

L'expression de la Rabphiline dépendrait pour une part de la présence de Rab3a ou de Rab3c. Les données issues du KO de Rab3a chez la souris indiquent en effet que l'expression de la Rabphiline y est largement diminuée (de 40 à 50%, malgré un taux normal d'ARNm ; Geppert *et al.*, 1994a). La Rabphiline résiduelle est délocalisée dans le corps cellulaire des neurones qui n'expriment pas non plus Rab3c (Li *et al.*, 1994a), indiquant que l'expression de la Rabphiline, sa stabilité et sa localisation synaptique dépendraient de la présence de Rab3a ou de Rab3c. L'incubation de VS en présence de GDP ou de Rab-GDI extrait en même temps Rab3 et la Rabphiline de la surface de ces compartiments (Stahl *et al.*, 1996). Enfin, la stimulation de l'exocytose provoque la dissociation de Rab3 et de la Rabphiline de la membrane des VS (Fischer von Mollard *et al.*, 1991; Stahl *et al.*, 1996). Ces observations indiquent que Rab3 permet le recrutement de la Rabphiline sur les VS.

III.C.4.a.iv. Fonctionnalité de l'interaction Rab3/Rabphiline

S'il est admis que Rab3 et la Rabphiline interagissent, *in vitro* et *in vivo*, la signification fonctionnelle de cette interaction reste incertaine. Les données évoquées précédemment (Li *et al.*, 1994a) suggèrent que Rab3 recrute la Rabphiline aux membranes des vésicules synaptiques. Cependant, d'autres données indiquent que la Rabphiline peut être recrutée sur les vésicules en l'absence de Rab3 (Shirataki *et al.*, 1994; McKiernan *et al.*, 1996; Arribas *et al.*, 1997). Cette association de la Rabphiline aux membranes en l'absence de Rab3 pourrait impliquer ses domaines C2, ainsi que les régions riches en proline du domaine

central (Arribas *et al.*, 1997). Cependant, cette association semble aussi dépendre d'une interaction protéine/protéine, dans la mesure où le décapage par la trypsine des vésicules synaptiques empêche cette liaison (Shirataki *et al.*, 1994).

III.C.4.a.v. Rôle de la Rabphiline dans le contrôle de l'exocytose

De nombreuses études ont démontré que la Rabphiline avait, tout comme Rab3, un rôle dans l'exocytose. Cependant, alors que Rab3 a un rôle (apparemment) inhibiteur sur la sécrétion, la Rabphiline stimule cette activité, du moins dans la majorité des études.

Par exemple, dans les cellules chromaffines, la surexpression de la Rabphiline entière stimule l'exocytose (des mutants tronqués d'un ou des deux domaines C2 l'inhibent fortement ; Chung *et al.*, 1995). Inversement, cette même étude montre que la réduction d'expression de la Rabphiline (par ARN antisens) inhibe la sécrétion. On notera que les deux domaines C2 de la Rabphiline ne semblent pas jouer un rôle équivalent dans ce processus : le domaine C2-A ne semble pas capable d'inhiber la sécrétion, à l'inverse du C2-B (Komuro *et al.*, 1996) et voir également (Oishi *et al.*, 1996).

Il a également été démontré qu'un peptide correspondant à une partie des domaines C2 et capable d'inhiber la liaison de la Rabphiline aux phospholipides abolit spécifiquement l'étape de l'exocytose dépendante de l'ATP (Chung *et al.*, 1998). Néanmoins, étant donné la grande conservation des domaines C2 entre les protéines possédant ces modules fonctionnels, il est difficile d'imputer ces effets à la Rabphiline de façon non ambiguë.

Enfin, la micro-injection des fragments amino- et carboxy-terminaux de la Rabphiline inhibent l'exocytose dépendante du Ca^{2+} des granules corticaux dans l'ovocyte de souris (Masumoto *et al.*, 1996), alors que la forme entière n'affecte pas ce processus. De façon à peu près similaire, l'injection dans la synapse géante de calmar des domaines N- ou C-terminaux inhibe la libération des neurotransmetteurs (Burns *et al.*, 1998). De plus, cette étude suggère que la forme complète de Rabphiline inhibe également l'endocytose.

On le voit, le rôle de la Rabphiline dans l'exocytose, dépendant ou indépendant de Rab3, n'est pas clair. Si la réalité de l'interaction entre ces deux protéines ne semble pas contestable, la signification fonctionnelle de ce lien reste floue. Durant ces quatre dernières

années, se sont accumulés des arguments expérimentaux contre le rôle de la Rabphiline dans l'exocytose :

Alors que le KO de Rab3 chez la souris entraîne certaines altérations (certes subtiles) de la transmission synaptique, rien de tel n'est vu chez les souris déficientes en Rabphiline. Rab3 est parfaitement localisé sur les vésicules synaptiques de ces animaux (à l'inverse du défaut de localisation de la Rabphiline dans le KO de Rab3a) et les paramètres électrophysiologiques affectés chez les animaux KO pour Rab3a sont normaux (Schlüter *et al.*, 1999).

Un autre argument est la stimulation observée de l'exocytose par des mutants de Rabphiline ne liant plus Rab3 (Joberty *et al.*, 1999). De façon symétrique, des mutants de Rab3a ne liant plus la Rabphiline inhibent néanmoins l'exocytose dans les cellules chromaffines et PC12 (Chung *et al.*, 1999), ainsi que dans les cellules β (Coppola *et al.*, 1999).

III.C.4.a.vi. Rôles de la Rabphiline à d'autres étapes du cycle des VS

Il est intéressant de noter que la Rabphiline pourrait avoir des effets sur d'autres aspects du trafic vésiculaire, peut-être indépendamment de Rab3.

D'une part, la Rabphiline pourrait jouer un rôle dans la mobilité des organelles le long des filaments d'actine, son domaine amino-terminal étant capable de lier l' α -actinine en compétition avec Rab3:GTP (Kato *et al.*, 1996). L'interaction de la Rabphiline avec la β -adducine, une autre protéine associée au cytosquelette d'actine, va dans le même sens (Miyazaki *et al.*, 1994). La Rabphiline pourrait avoir également une interaction fonctionnelle avec le complexe SNARE, de façon indépendante de sa liaison à Rab3 (Staunton *et al.*, 2001).

Enfin, la Rabphiline semble avoir un rôle dans l'endocytose ; dans l'étude menée à la synapse géante de calmar précédemment citée, l'injection des domaines N- et C-terminaux, ainsi que de la protéine entière, s'accompagne d'effets importants sur la morphologie de la terminaison et sur les compartiments endocytiques (Burns *et al.*, 1998). De plus, la Rabphiline interagit avec la rabaptine-5, un effecteur de Rab5, une petite protéine G impliquée dans

l'endocytose (Ohya *et al.*, 1998). L'ensemble de ces données suggère ainsi un rôle intéressant de la Rabphiline dans le couplage entre exo- et endocytose.

On notera également que la Rabphiline interagit non seulement avec les Rab3 (les 4 isoformes), mais également avec Rab8 ainsi qu'avec Rab27 (a et b) (Fukuda, 2003) (et nos données non publiées). De futures études devront détailler les implications fonctionnelles de ces interactions.

III.C.4.b. RIM

Plus récemment, un autre effecteur de Rab3 a été isolé par l'approche du double hybride et dénommé RIM, pour Rab3 Interacting Molecule (Wang *et al.*, 1997a). En fait, il existe 2 protéines RIM, dénommées RIM1 et RIM2, codées par des gènes distincts. Chacune semble avoir de nombreux variants d'épissage potentiels (Wang *et al.*, 2000). Ces protéines partagent certaines similitudes avec la Rabphiline ; comme elle, les RIM contiennent un domaine hélicale N-terminal suivi d'un domaine en doigt à zinc. Ils comportent également 2 domaines C2, ainsi que le motif "SGAWFF" dont l'importance a été démontrée pour l'interaction de la Rabphiline avec les domaines CDR de Rab3. Cependant, de nombreux points distinguent RIM et la Rabphiline, comme l'existence d'un domaine central PDZ, absent de la Rabphiline. De plus, l'expression des RIM est exclusivement neuronale, à l'inverse de la Rabphiline, et ces protéines sont exclusivement associées à la membrane plasmique, plus spécifiquement au niveau des zones actives. Les RIM sont, avec Bassoon et Piccolo, des protéines spécifiques de la zone active.

Le fait que RIM intervienne dans le contrôle de la libération des hormones et des neurotransmetteurs a été suggéré par l'augmentation de sécrétion induite par la surexpression de son domaine de liaison à Rab3 dans des cellules PC12 (Wang *et al.*, 1997a) et des cellules sécrétrices d'insuline (Iezzi *et al.*, 2000).

III.C.4.b.i. KO de RIM chez la souris et le nématode

Les souris déficientes en RIM1 ne présentent pas de défaut visible de la neurotransmission basale, ni de modification du nombre de VS arrimées à la zone active (Castillo *et al.*, 2002; Schoch *et al.*, 2002). La plasticité synaptique à court terme n'est pas

altérée dans les fibres moussues de l'hippocampe (Paired-Pulse Facilitation, Frequency Facilitation) (Castillo *et al.*, 2002), mais semble affectée aux synapses entre la collatérale de Schaffer et les cellules pyramidales de la région CA1 (synapses excitatrices) et dans des synapses inhibitrices de la même région (Schoch *et al.*, 2002). La potentialisation à long terme dans les fibres moussues de l'hippocampe (mfLTP) et les fibres parallèles des cellules de Purkinje (pfLTP) est fortement diminuée, tandis que la dépression synaptique à long terme (LTD) et la potentialisation post tétanique (PTP, une forme de "mémoire courte", mais à plus long terme tout de même que la PPF) sont également accrues en l'absence de RIM1 (Castillo *et al.*, 2002). De façon étonnante, bien que la libération basale ne semble pas affectée chez ces animaux, la probabilité de libération est diminuée (Schoch *et al.*, 2002).

Alors que les conséquences électrophysiologiques de l'inactivation de RIM1 chez la souris sont assez modérées (peut-être en raison d'une possible compensation fonctionnelle par RIM2), elles sont plus sévères lors de l'inactivation de *unc-10* (l'homologue de RIM, unique isoforme) chez *C. elegans*. Chez cet organisme, le KO de RIM diminue fortement la compétence pour la fusion des vésicules synaptiques ; de plus, et comme observé dans le KO de RIM1 chez la souris (Schoch *et al.*, 2002), le nombre inchangé de vésicules amarrées à la membrane suggère un rôle postérieur à l'arrimage pour RIM (Koushika *et al.*, 2001).

Du point de vue électrophysiologique, il est intéressant de faire le parallèle entre les conséquences des KO de Rab3a et de RIM1. Dans les deux cas, on observe une baisse prononcée de la mfLTP et une augmentation de la PPF dans la région CA1. En revanche, certains aspects du KO de RIM1 ne sont pas observés chez les animaux déficients pour Rab3a, comme l'augmentation de la PTP (Schoch *et al.*, 2002) et de la LTD, et surtout une baisse de la probabilité de libération (P), qui semble inchangée dans le KO de Rab3a (Geppert *et al.*, 1997). Chez le nématode, le croisement d'animaux KO pour RIM et KO pour Rab3 donne naissance à une progéniture dont les défauts sont identiques à ceux observés chez les animaux dépourvus de RIM, suggérant que l'action de Rab3 passe essentiellement par le biais de son interaction avec RIM (Koushika *et al.*, 2001). L'altération de la mfLTP chez les souris KO pour Rab3a (Castillo *et al.*, 1997) pourrait être rapprochée de celle observée chez le KO de RIM1, et qui n'est pas reproduite chez les animaux dépourvus de Rabphilin (Schlüter *et al.*, 1999).

III.C.4.b.ii. Interaction RIM/Munc13

Il a également été démontré que RIM1 interagit avec Munc13-1 (Betz *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001), par le biais de son domaine en doigt à zinc. Munc13 est une protéine importante pour la phase d'amorçage de l'exocytose (priming), où elle exercerait son rôle en "ouvrant" la syntaxine pour permettre la formation du complexe SNARE (Figure 45). Chez le nématode, la surexpression d'une forme constitutivement ouverte de syntaxine permet d'éliminer totalement les effets de la suppression de RIM (Koushika *et al.*, 2001). De plus, l'inactivation de l'interaction Munc13-1/RIM1 entraîne un défaut de compétence des vésicules synaptiques, comme cela est produit par l'inactivation du gène codant Munc13-1 (Betz *et al.*, 2001). Il y a donc une interaction physique et fonctionnelle entre RIM et Munc13. RIM pourrait permettre notamment le recrutement de Munc13 à la zone active. On observe en effet une diminution de la quantité de Munc13-1 (~50% du sauvage) chez le KO de RIM-1 (Schoch *et al.*, 2002) qui pourrait expliquer le défaut de mfLTP observé dans le KO de RIM1. Cependant, la mfLTP n'est pas affectée chez les animaux Munc13-1 +/- (présentant des niveaux de Munc13-1 de l'ordre de 50% des sauvages), même s'il est envisageable que la concentration locale de Munc13 à la zone active des animaux KO pour RIM1 soit encore plus basse que dans le cas d'animaux hétérozygotes pour Munc13.

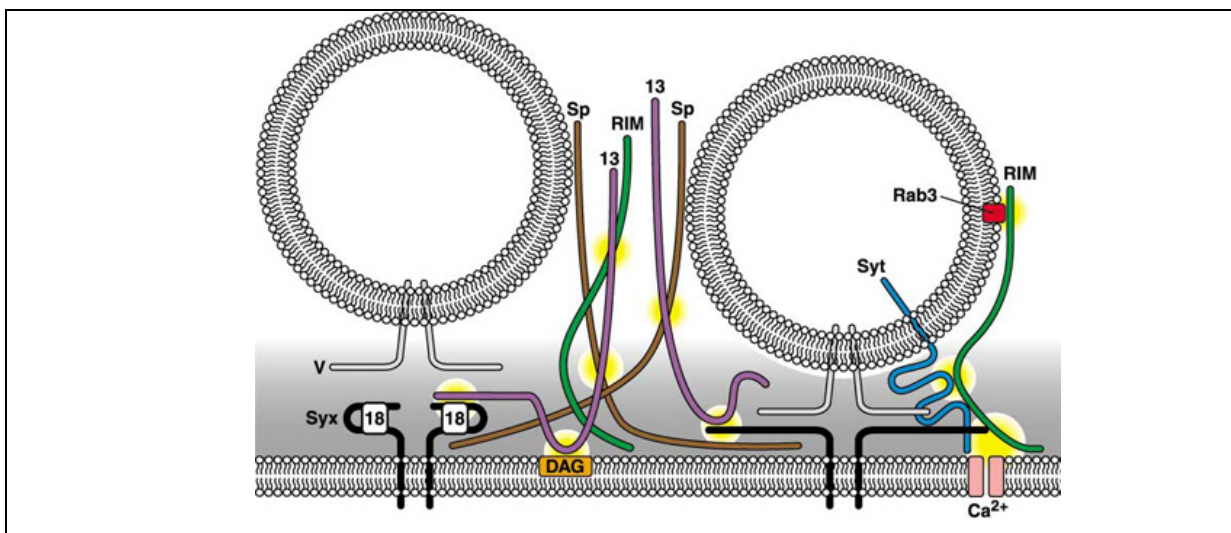


Figure 45

Un aperçu des interactions protéiques pouvant entrer en jeu dans la réaction de "priming" ou amorçage. Munc13 servirait à "l'ouverture" de la syntaxine pour permettre l'association en *trans* du complexe SNARE. Plusieurs arguments suggèrent que RIM pourrait jouer un rôle dans cette étape. En particulier, les défauts liés à la suppression de *unc-10* (RIM chez le nématode) peuvent être entièrement compensés par l'expression d'une forme constitutivement ouverte de syntaxine (Koushika *et al.*, 2001). RIM pourrait également jouer dans l'étape d'arrimage ("docking") par son interaction avec Rab3 présente sur les VS.

Syt : synaptotagmine (bleu) ; Syx : syntaxine (noir) ; 13 : Munc13 (violet) ; 18 : Munc18 ; V : VAMP (blanc) ; Sp : Spectrine (marron). Illustration tirée de Martin, 2002.

La comparaison, chez le nématode entre des animaux KO pour RIM et KO pour RIM et Rab3 suggère que certains effets de Rab3 pourraient passer par RIM. De plus, les similarités entre certains aspects des phénotypes électrophysiologiques des souris KO pour Rab3a ou pour RIM suggèrent une liaison fonctionnelle.

En résumé, des évidences fortes plaident pour un rôle majeur de RIM dans la phase d'amorçage des vésicules synaptiques ; sa localisation (exclusivement à la membrane plasmique) et son interaction fonctionnelle avec Munc13-1 vont dans ce sens. Une possibilité serait que RIM joue un rôle double, à la fois dans les étapes de "docking" et de "priming". RIM pourrait interagir avec Rab3, présente sur les VS approchant de la membrane plasmique. Cette interaction dissocierait RIM de Munc13, qui pourrait alors interagir avec la syntaxine, en déplaçant Munc18.

On notera aussi que RIM1 interagit, en plus de Rab3 (les 4 isoformes), avec Rab6 (Wang *et al.*, 2001), Rab10, Rab26 et Rab37 (Fukuda, 2003). RIM2, quant à lui, interagit avec Rab8a, en plus des 4 isoformes Rab3a/b/c/d (Fukuda, 2003). Comme pour la Rabphiline, qui interagit avec d'autres GTPases, les implications fonctionnelles de ces interactions devront être clarifiées dans le futur.

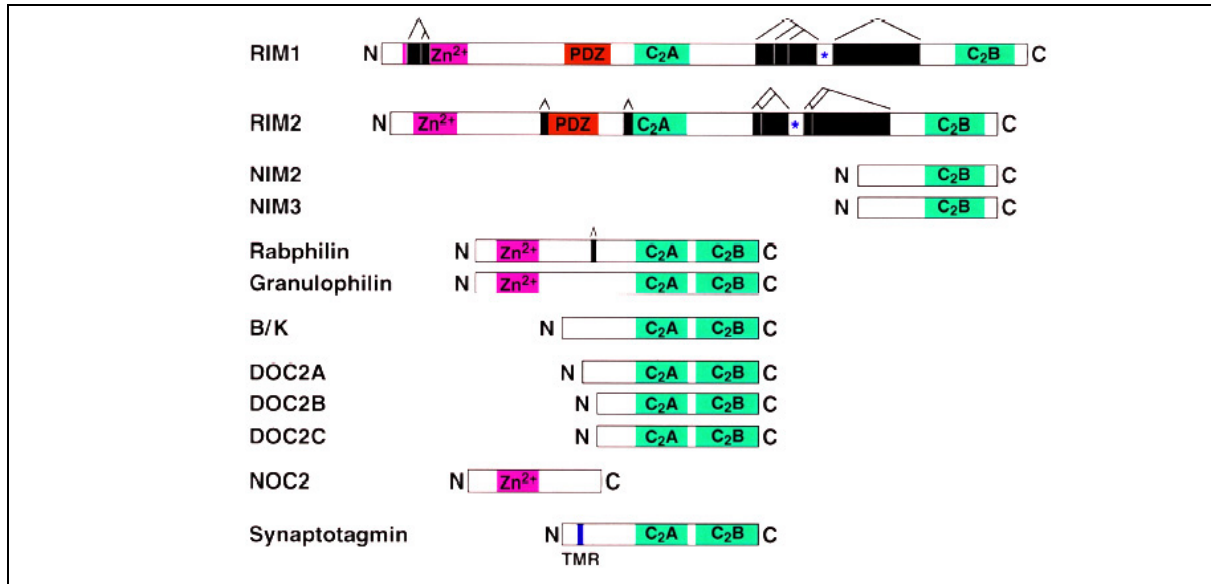


Figure 46

Protéines à domaines C2 impliquées dans le contrôle de l'exocytose. RIM1 et RIM2, des effecteurs de Rab3a, possèdent chacun de nombreux variants d'épissage. La Rabphiline, autre effecteur de Rab3, possède également 2 domaines C2 ; la granulophiline, ressemblant à la Rabphiline, est un effecteur de Rab27 (voir la partie consacrée à cette Rab). NOC2, fortement similaire à la partie N-terminale de la Rabphiline, est un effecteur de Rab3 au rôle mal défini ne possédant pas de domaine C2. Ces partenaires de Rab3 contenant des domaines capables de lier le Ca²⁺ posent la question de l'implication de Rab3 dans les mécanismes liant l'influx calcique au déclenchement de la libération des hormones et des neurotransmetteurs. Issu de Wang *et al.*, 2000.

III.C.4.c. Noc2

Noc2 (302 acides aminés, 38 kDa) serait un autre effecteur de Rab3, identifié par homologie avec la Rabphilin, possédant 77% de similarité avec celle-ci. De façon schématique, Noc2 représente la partie N-terminale de la Rabphilin, c'est-à-dire contenant le motif en doigt à zinc, mais privée des domaines C2 (d'où son nom, No C2 domains ; Kotake *et al.*, 1997). Noc2 se distingue de la Rabphilin (expression large dans les tissus sécréteurs, neuronaux et endocrines) et de RIM (expression exclusivement neuronale) par son expression très majoritairement endocrine. Cette protéine, cytosolique, stimule la sécrétion de cellules PC12 (dépolarisation par application de 60 mM K⁺). De façon surprenante, aucune interaction de Noc2 avec Rab3a/b/c n'a été détectée par les auteurs, dans des conditions où la Rabphilin s'y lie, fait également rapporté dans une autre étude (Coppola *et al.*, 1999).

Cependant, le groupe de Robert Burgoyne (Liverpool) démontre, non seulement que Noc2 lie Rab3a (forme liée au GTP), mais que la surexpression de Noc2 *inhibe* la sécrétion de cellules PC12 (Haynes *et al.*, 2001).

Comme la Rabphilin et RIM, Noc2 possède un motif SGAWFF, dont l'importance a déjà été soulignée dans l'interaction avec Rab3. La mutation de ce motif (en SGAAAA) induit une perte totale d'interaction avec Rab3. De plus, la mutation de la valine 58 en alanine (équivalent à la mutation V61A de la Rabphilin, altérant l'interaction Rab3/Rabphilin, (Joberty *et al.*, 1999)) induit une diminution partielle de l'affinité de Noc2 pour Rab3 (~50%). Ces deux mutations (AAA et V58A) suppriment l'inhibition de Noc2 dans les cellules PC12, suggérant que l'effet de Noc2 soit dépendant de son interaction avec Rab3. L'expérience symétrique (mutant de Rab3 déficient pour la liaison à Noc2) n'a, pour l'heure, pas été réalisée. On notera que Noc2, en plus de son interaction avec Rab3(a/b/c/d) est également capable de lier Rab8a, ainsi que les deux isoformes de Rab27 (a/b) (Fukuda, 2003).

Par ailleurs, une interaction de Noc2 avec la zyxine, un composant cytosquelettique, a été détectée par l'approche du double hybride et confirmé par coimmunoprécipitation, suggérant un rôle pour Noc2 dans le trafic des organelles sécrétoires en rapport avec le cytosquelette (Kotake *et al.*, 1997).

En résumé, les données disponibles sur Noc2 restent contradictoires mais suggèrent que cette protéine pourrait avoir un rôle dans l'exocytose dépendant de Rab3.

III.C.4.d. Calmoduline

La calmoduline (CaM) est une protéine ubiquiste contenant 4 domaines de liaison au Ca^{2+} ; une interaction entre Rab3 et la calmoduline dépendante du Ca^{2+} a pu être démontrée (Park *et al.*, 1997). On notera cependant que la CaM n'est pas vraiment un effecteur de Rab3 au sens classique du terme, celle-ci semblant lier à la fois les formes Rab3:GDP et Rab3:GTP. La CaM est capable d'extraire Rab3 de la membrane de synaptosomes en présence de Ca^{2+} (Park *et al.*, 1997).

L'interaction Rab3/CaM implique la région 62-85 de Rab3, et la mutation des arginines en positions 66 et 70 diminue fortement l'interaction avec la CaM (Coppola *et al.*, 1999), sans affecter la liaison à RIM ou à la Rabphiline. De façon intéressante, ces deux arginines ne sont pas conservées dans d'autres familles de Rab, suggérant un certain degré de spécificité pour cette interaction. Ces auteurs (Coppola *et al.*, 1999) proposent un rôle majeur pour l'interaction fonctionnelle Rab3/CaM, dans la mesure où l'effet inhibiteur sur la sécrétion de cellules PC12 et HIT-T15 du mutant Q81L est totalement supprimé par des mutations sur ces positions R66 et R70.

Cependant, la liaison de Rab3 à la CaM semble inutile dans certains systèmes pour l'action de Rab3 sur la sécrétion, comme l'indique la conservation de l'effet d'un tel mutant dans la réaction acrosomique (Yunes *et al.*, 2002). De plus, les données concernant l'absence d'inhibition du mutant de Rab3 ne liant pas la calmoduline (Coppola *et al.*, 1999) sont démenties par un récent travail des groupes de T. Südhof et R. Jahn (Schluter *et al.*, 2002). Ainsi, l'hypothèse selon laquelle la calmoduline serait un effecteur important de Rab3 ne peut être considérée comme démontrée. Cette hypothèse est néanmoins intéressante, compte tenu de travaux suggérant son implication dans les étapes tardives de l'exocytose dans les cellules chromaffines (Okabe *et al.*, 1992; Chamberlain *et al.*, 1995; Kibble *et al.*, 1996) et dans l'étape finale (dépendante du Ca^{2+}) de la fusion homotypique des vacuoles chez la levure (Peters *et al.*, 1998).

III.C.4.e. Rak3D

Rak3D, ou kinase associée à Rab3d, a été décrite récemment comme capable de phosphoryler l'extrémité N-terminale de la syntaxine-4 (Pombo *et al.*, 2001). Cette phosphorylation entraîne une diminution de l'interaction de la syntaxine-4 avec son partenaire SNAP23, un homologue de SNAP-25 (voir la partie consacrée au SNARE dans l'introduction générale). Une implication potentielle de telles phosphorylations pour la régulation de l'étape de "priming" sera rediscutée dans la partie consacrée aux résultats sur Rab3.

III.C.4.f. PI3K

Récemment, il a été démontré une interaction directe entre Rab3b:GTP et la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K ; Francis *et al.*, 2002). Ces auteurs observent une augmentation de l'accumulation de [³H]noradrénaline dans des cellules PC12 surexprimant Rab3b (et Rab3a, dans une moindre mesure), avec augmentation apparente du V_{max} , et sans modification du K_m . Elle semble indépendante des transporteurs plasmiques, car elle persiste en cellules perméabilisées. Dans la mesure où ni le nombre ni la taille des granules ne semblent affectés par l'expression de Rab3b, les auteurs proposent que l'effet observé résulte d'un accroissement du nombre de VMAT par granule (ou du V_{max}) ou d'une augmentation de $\Delta\mu H$. L'inhibition de la PI3K par la wortmannine ou le LY294002 se traduit par une diminution de l'accumulation de [³H]noradrénaline, sans que le mécanisme d'action de la PI3K sur l'accumulation vésiculaire soit compris. La rapidité d'action de ces inhibiteurs excluerait néanmoins un rôle de la PI3K sur le nombre de granules et le nombre de VMAT par granule.

Cette information est intéressante, dans la mesure où elle fait écho au cas de Rab5, qui recrute la PI3K hVPS34 (Christoforidis *et al.*, 1999). Dans le modèle proposé par Zerial et coll., Rab5 recruterait EEA1, un effecteur impliqué dans le docking et la fusion des endosomes. Rab5 recrute également hVPS34, qui créerait localement un domaine riche en PI(3)P, auquel se fixe EEA1 par le biais de son domaine FYVE (de même que d'autres effecteurs de Rab5, comme la Rabenosyne-5 ; Nielsen *et al.*, 2000). La constitution de microdomaines riches en PI(3)P permet ainsi une meilleure rétention et une concentration locale des effecteurs de Rab5 (voir Figure 47).

Il est cependant difficile de faire un parallèle avec Rab3, les effecteurs connus de Rab3 ne liant pas le PI(3)P (le domaine FYVE de la Rabphiline lie la phosphatidylsérine et le PIP₂).

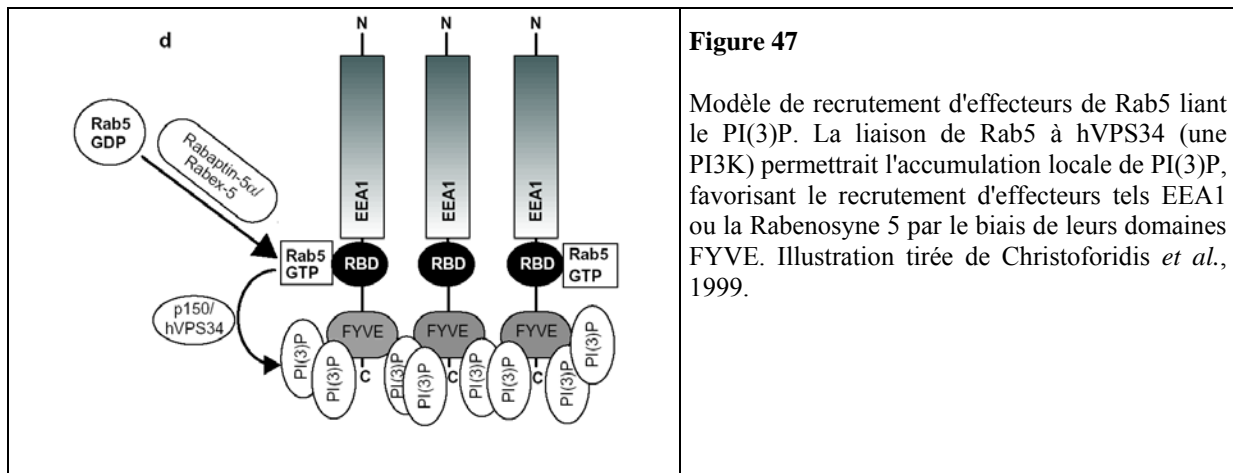


Figure 47
 Modèle de recrutement d'effecteurs de Rab5 liant le PI(3)P. La liaison de Rab5 à hVPS34 (une PI3K) permettrait l'accumulation locale de PI(3)P, favorisant le recrutement d'effecteurs tels que EEA1 ou la Rabenosyne 5 par le biais de leurs domaines FYVE. Illustration tirée de Christoforidis *et al.*, 1999.

III.C.4.g. Synapsines

Les synapsines sont des phosphoprotéines impliquées dans l'approvisionnement en VS ou GS de la zone active. Ces protéines lient à la fois les VS et des composants du cytosquelette, en particulier l'actine. Ces protéines semblent jouer un rôle important dans le contrôle du pool de VS de réserve, mais également dans celui directement disponible pour l'exocytose (Humeau *et al.*, 2001a), en relation avec le cytosquelette d'actine (Bloom *et al.*, 2003). Très récemment, F. Benfenati (Genova, Italie) a rapporté l'existence d'un lien physique entre Rab3a et la synapsine 1 (communication orale lors de la 5^{ème} réunion du Club Exocytose-Endocytose, Bitche 2003). De façon étonnante, les premiers résultats de ce groupe montreraient que la synapsine 1 possède une activité GAP sur Rab3a; inversement, Rab3a inhiberait l'oligomérisation de la synapsine 1 et des processus physiologiques en découlant, comme le regroupement des VS. Ces données, bien que préliminaires, sont très excitantes; elles abordent la possibilité que Rab3 puisse jouer un rôle dans le recrutement et/ou la mobilité des VS ou des GS, aspect que l'on pouvait suspecter au regard des défauts de localisation (Nonet *et al.*, 1997) ou de recrutement des VS (Leenders *et al.*, 2001) chez des animaux déficients en Rab3 (nématode et souris, respectivement). La suite de ces travaux devrait apporter des éléments importants pour la compréhension des mécanismes d'action de Rab3.

III.D. Résultats : Caractérisation de l'effet inhibiteur de Rab3a:GTP dans des cellules neuroendocrines.

Une question centrale concernant le rôle de Rab3 est de déterminer à quelle(s) étape(s) du processus d'exocytose régulée s'exerce son action. L'étude des effets de Rab3 et de ses effecteurs suggère l'implication de Rab3 dans plusieurs étapes du trafic vésiculaire, allant du recrutement des VS jusqu'à la fusion. Il semble difficile d'intégrer, sans contradiction, la totalité des données provenant de ces études dans un modèle unique. Comme nous l'avons déjà avancé, cette confusion peut venir du fait que la fonction de Rab3 a sans doute plusieurs facettes, plus ou moins apparentes selon le modèle expérimental et la méthode choisie.

Rab3 pourrait agir dans le recrutement des VS à la membrane plasmique, comme l'indiquent, d'une part, les défauts de localisation (Nonet *et al.*, 1997) ou de recrutement des VS (Leenders *et al.*, 2001) ainsi que l'augmentation de la dépression synaptique (Geppert *et al.*, 1994a) observés chez les animaux KO pour Rab3 et, d'autre part, la modification du nombre de granules arrimés dans des PC12 surexprimant Rab3 (Martelli *et al.*, 2000). D'autres données souligneraient un effet de Rab3 dans l'étape de "priming".

Nous avons tenté de mieux cerner les caractéristiques de l'effet inhibiteur du mutant Rab3aQ81L. Les modèles expérimentaux que nous avons choisis sont les cellules chromaffines de la glande médullosurrénale bovine, où la méthode de mesure adoptée pour caractériser l'activité sécrétrice est l'ampérométrie à fibre de carbone, et les cellules de la lignée neuroendocrine PC12 ; dans ces dernières, l'activité sécrétrice a été caractérisée soit au niveau unicellulaire par la technique ampérométrique, soit par le biais du test de sécrétion sur population de cellules après cotransfection par SERT.

Le but de ces études était d'acquérir des données cinétiques susceptibles de fournir une indication quant à l'étape fonctionnelle où agit Rab3a:GTP.

III.D.1. Rab3aQ81L inhibe préférentiellement les phases précoces de la sécrétion régulée.

III.D.1.a. Effet de Rab3aQ81L sur la sécrétion de populations de cellules PC12.

Nous avons mesuré l'effet inhibiteur de Rab3aQ81L sur la sécrétion de [³H]5-HT par des cellules PC12 au cours du temps (Figure 48). On constate une forte inhibition par Rab3aQ81L pour des temps courts de stimulation, puis une réduction de cet effet pour des temps plus longs. De plus, l'examen des pentes des activités sécrétrices suggère que le taux de sécrétion, fortement affecté entre 0 et 2 minutes, soit normalisé par rapport au contrôle entre 2 et 10 minutes. Ceci impliquerait un effet sélectif de Rab3aQ81L sur les premières phases de la sécrétion. La résolution temporelle du test sur population ne permet pas de résoudre avec une bonne précision l'activité sécrétrice des cellules pour des temps courts. Ainsi avons-nous cherché à résoudre plus finement les premières dizaines de secondes de la sécrétion grâce à la détection électrochimique des catécholamines par ampérométrie à fibre de carbone

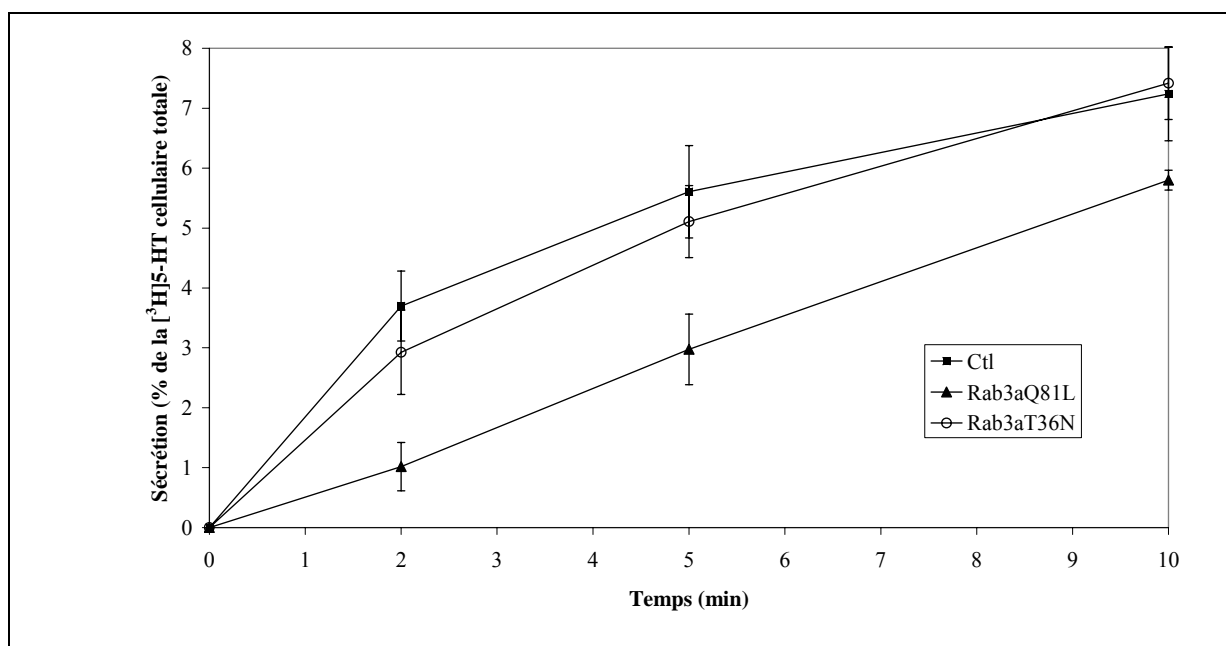


Figure 48

Effet de l'expression de Rab3aQ81L sur l'activité sécrétrice de cellules PC12, déterminée par la sécrétion de [³H]5-HT. Chaque point représente la moyenne \pm ES de trois déterminations.

L'expression du mutant dépourvu d'activité GTPasique (Rab3aQ81L) inhibe fortement l'activité sécrétrice des cellules PC12 pour des temps courts de stimulation (-58 ± 10 % moyenne \pm ES, n=4, à 2 minutes) ; l'inhibition par Rab3aQ81L diminue ensuite en fonction du temps (-38 ± 8 %, moyenne \pm ES, n=4, à 5 minutes).

L'effet inhibiteur de Rab3aQ81L est donc en moyenne 1,7 fois plus fort à 2 minutes qu'à 5 minutes de stimulation. ($1,7 \pm 0,3$ fois, moyenne \pm ES, n=4). L'expression du mutant Rab3aT36N (forme constitutivement liée au GDP) n'a aucun effet sur l'activité sécrétrice des cellules par rapport aux cellules contrôles.

III.D.1.b. Effet de Rab3aQ81L sur la sécrétion de cellules PC12 et chromaffines bovines individuelles mesurée par ampérométrie à fibre de carbone.

La Figure 49 représente les activités sécrétrices moyennes cellules PC12 contrôles (n=17) et de cellules exprimant Rab3aQ81L (n=8), stimulées par perfusion locale d'une solution dépolarisante contenant 55 mM K⁺, et enregistrées durant ~2 minutes.

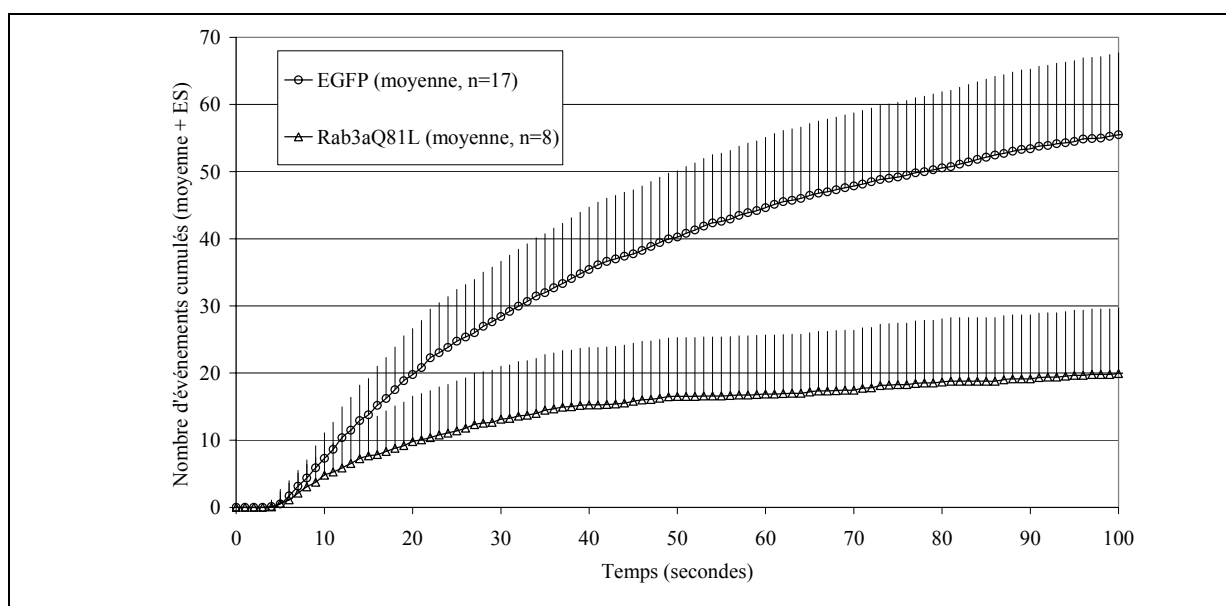


Figure 49

Représentation graphique de l'activité sécrétrice moyenne en fonction du temps pour chaque groupe de cellules. L'inhibition de la sécrétion par Rab3aQ81L est bien visible pour des temps courts de stimulation, malgré une dispersion assez prononcée des activités sécrétrices individuelles (non montrée). La stratégie adoptée consiste en une approche de triple cotransfection avec SERT (pEGFP+pRcCMV-SERT+pcDNA3 ou pcDNA3-Rab3aQ81L), suivie d'une incubation en présence de 5-HT pour augmenter la taille des signaux ampérométriques (voir partie consacrée à SERT). La sécrétion est stimulée à t=5 sec. par l'application locale d'une solution dépolarisante (55 mM K⁺) pendant 2 minutes.

La taille des événements ampérométriques dans les cellules PC12 étant faible (5-10 pA), nous avons tiré profit du système développé pour la mesure sur population de la sécrétion de [³H]5-HT après cotransfection par SERT. Les transfusions réalisées dans cette étude sont triples (pEGFP, pRcCMV-SERT, pcDNA3 (vecteur vide) ou pcDNA3-Rab3aQ81L). L'expression de la EGFP permet le repérage des cellules effectivement transfectées, tandis que l'expression de SERT favorise l'accumulation de 5-HT dans les

cellules, amenant une considérable augmentation de la taille des événements ampérométriques mesurés (voir le chapitre consacrée à SERT).

On observe une inhibition rapide de l'activité sécrétrice par Rab3aQ81L, avec un fort effet sur le taux de sécrétion durant les premières dizaines de secondes. Pour des temps plus longs (voir Figure 49 à 80-100 sec.), les taux de sécrétion des cellules contrôles et exprimant Rab3aQ81L tendent à se normaliser, confirmant les observations issues du test sur population de cellules (voir Figure 48)

III.D.2. Rab3aQ81L induit un retard à l'initiation de la sécrétion.

Une étude parallèle a été menée sur des cellules chromaffines bovines transfectées, également par la technique ampérométrique ; les résultats obtenus sont globalement identiques à ceux trouvés dans les cellules PC12 (voir les ampérogrammes d'une cellule chromaffine contrôle et exprimant Rab3aQ81L, Figure 50 A et B).

Un point intéressant ici est l'apparition d'un délai important entre l'application du stimulus (solution dépolarisante ou 40 μ M de nicotine) et les premiers événements ampérométriques détectés dans les cellules exprimant Rab3aQ81L. S'il est vrai que le « temps 0 » du début de la stimulation n'est pas extrêmement précis avec notre mode de stimulation (comme il pourrait l'être dans le cas d'une dépolarisation électrique appliquée en patch-clamp), la déflexion de la ligne de base observée par l'oxydation du Fast Green (un colorant oxydable ajouté à la solution stimulante, pour positionner correctement la pipette de stimulation et contrôler le flux de la solution de stimulation) permet cependant de "dater" assez convenablement le moment où l'électrode (et donc la cellule) est au contact du sécrétagogue appliqué. Les activités ampérométriques individuelles présentées dans la Figure 51 ont ainsi été recalées en prenant comme t_0 la déflexion accompagnant l'oxydation du Fast Green.

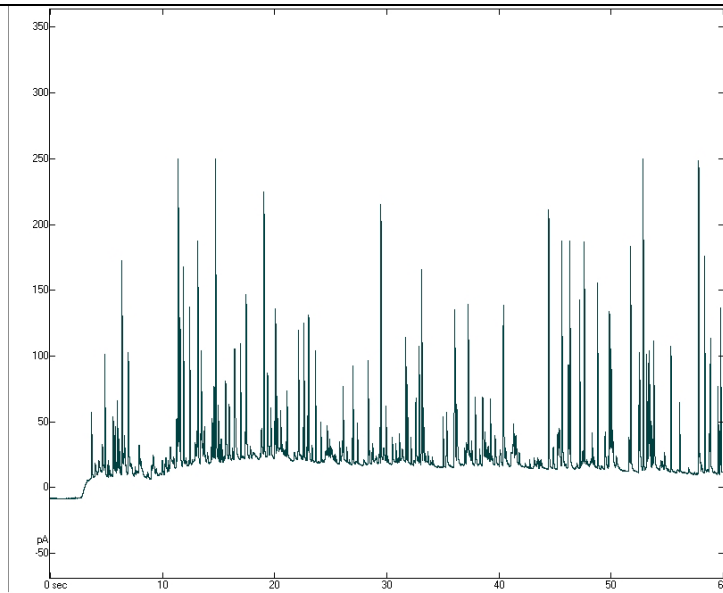
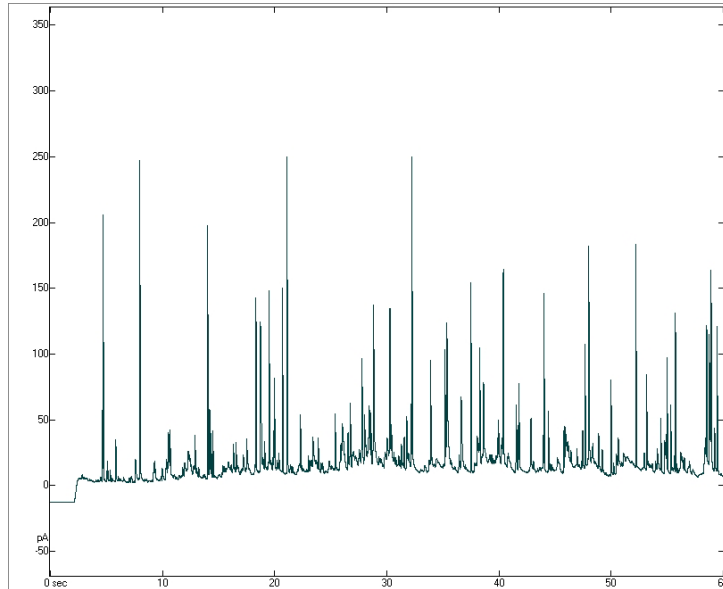


Figure 50

A) Exemple d'ampérométrie de cellule chromaffine bovine contrôlée (transfectée avec pEGFP et pcDNA3). La sécrétion est déclenchée par application locale d'une solution dépolarisante (55 mM K^+) ou contenant 40 μ M de nicotine. Chaque pic de courant représente l'oxydation du contenu d'un granule unique. La déflexion de la ligne de base ($t=5$ sec) correspond à l'oxydation du Fast Green, un colorant oxydable ajouté à la solution de stimulation pour permettre la visualisation et l'orientation du flux.



B) Exemple d'ampérométrie de cellule chromaffine bovine exprimant la EGFP et Rab3aQ81L. Outre une réduction de la fréquence des pics (comparer avec A), on constate l'augmentation du temps séparant le début de la stimulation (déflexion de la ligne de base) et l'apparition du premier événement ampérométrique détecté.

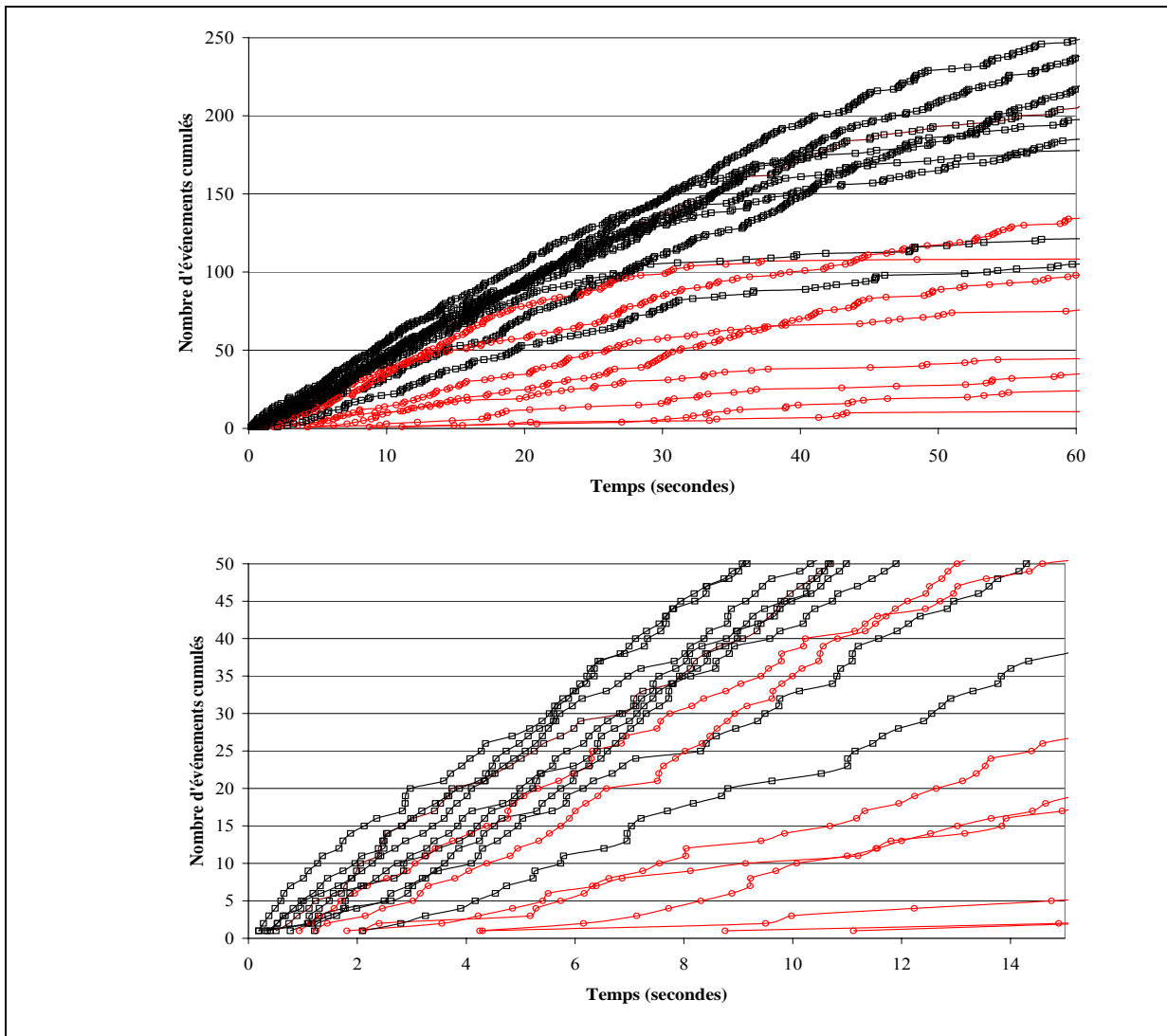


Figure 51

Panneau supérieur : dérouls temporel de l'activité sécrétrice de cellules chromaffines contrôles (traces noires) et exprimant Rab3aQ81L (traces rouges). Chaque trace individuelle est recalée pour t_0 = déflexion correspondant à l'oxydation du Fast Green présent dans la solution stimulatrice. Le panneau inférieur présente les 15 premières secondes de l'expérience. Dans les cellules exprimant Rab3aQ81L, on constate une augmentation considérable du temps requis pour démarrer la sécrétion (~6 fois plus de temps que dans les contrôles). Le taux moyen d'exocytose (estimé par la pente des traces) est également diminuée chez le mutant.

Tableau 10	Contrôle (n=9)	Rab3aQ81L (n=8)
Délai moyen stimulus/ 1 ^{er} pic : (moyenne \pm ES)	0,7 \pm 0,2 sec.	4,3 \pm 1,3 sec.
Fréquence des événements (10 sec. après le 1 ^{er} pic) : (moyenne \pm ES)	4,6 \pm 0,3 Hz	1,7 \pm 0,5 Hz

Ainsi, le temps nécessaire à l'apparition des premiers signaux détectables de sécrétion est environ 6 fois plus grand dans les cellules exprimant Rab3aQ81L. Si l'on s'intéresse à la fréquence d'apparition des événements dans une fenêtre temporelle réduite (10 secondes) située juste après l'apparition du premier pic de chaque cellule, on observe une différence nette entre les activités des cellules exprimant Rab3aQ81L et les contrôles, environ 3 fois plus faible (voir Tableau 10).

Pour résumer, les données issues du test sur population et les enregistrements ampérométriques nous indiquent que Rab3aQ81L augmente significativement le délai de réponse au stimulus, et que le taux de sécrétion des cellules exprimant Rab3aQ81L est fortement diminué dans les premières dizaines de secondes par rapport au contrôle, suivie d'une normalisation progressive (récupération d'un taux comparable au contrôle après 2 minutes, dans les cellules PC12).

III.D.3. Rab3aQ81L ne modifie pas la sensibilité de l'exocytose vis-à-vis du calcium.

Les données obtenues chez l'aplysie (Doussau *et al.*, 1998), par l'étude du KO de Rab3a chez la souris (Geppert *et al.*, 1997) et par l'approche antisens dans les cellules chromaffines (Johannes *et al.*, 1998) suggèrent une implication de Rab3 dans des phénomènes liés à la sensibilité au Ca^{2+} de l'exocytose. L'étude chez l'aplysie, en particulier, montre une diminution de l'effet inhibiteur de Rab3a:GTP sur la sécrétion lors d'une élévation de $[Ca^{2+}]_i$, provoquée par un train de dépolarisations à 50 Hz. Nous avons voulu caractériser dans notre système d'étude l'influence de la concentration calcique sur l'effet inhibiteur de Rab3a.

L'activité sécrétrice de cellules PC12 contrôles et exprimant Rab3aQ81L a été mesurée par le biais de la sécrétion de $[^3H]5-HT$ après cotransfection de SERT. Afin de contrôler $[Ca^{2+}]_i$, les cellules sont perméabilisées (digitonine, streptolysine-O ou α -toxine) et la sécrétion est déclenchée par l'application extracellulaire de solutions tamponnées de calcium (Figure 52).

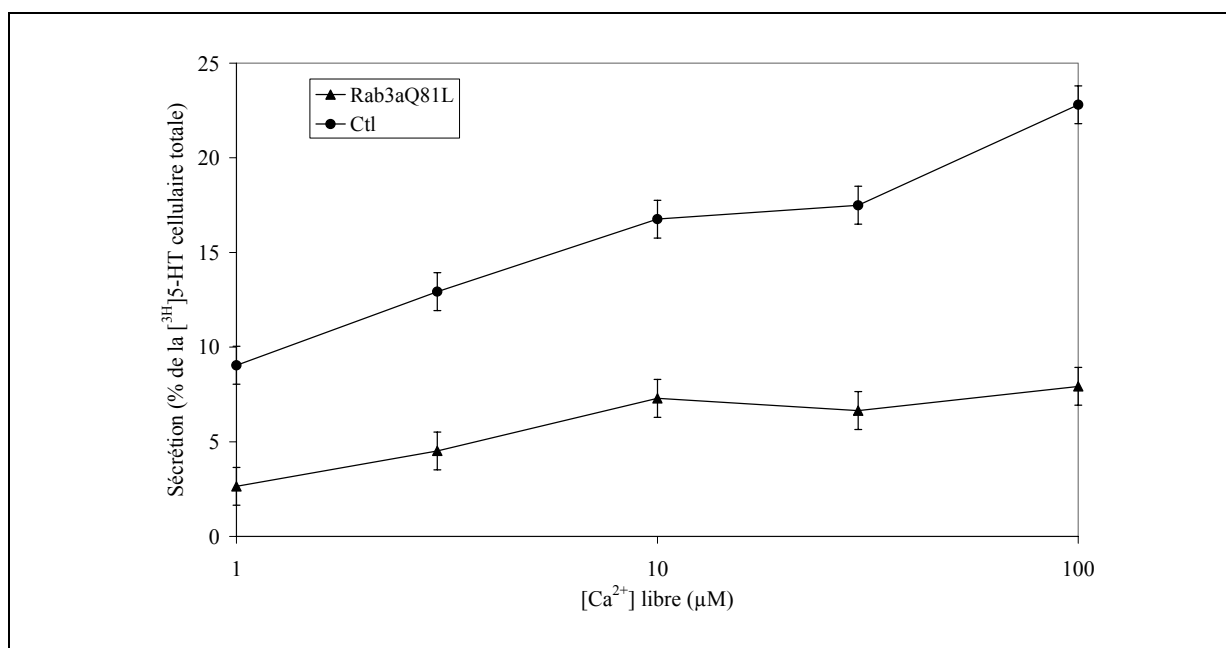


Figure 52

Effet inhibiteur de Rab3aQ81L sur l'activité sécrétrice de cellules PC12 contrôles (exprimant SERT et la EGFP) et de cellules exprimant Rab3aQ81L (et SERT), observé pour différentes concentrations de Ca²⁺ libre (5 minutes de stimulation ; signal spécifique, après soustraction du signal mesuré en l'absence de Ca²⁺ ; chaque point représente la moyenne \pm ES de 3 déterminations expérimentales).

Dans une large gamme de [Ca²⁺]_i (ici de 1 à 100 μM de Ca²⁺ libre), l'effet inhibiteur exercé par Rab3aQ81L sur l'activité sécrétrice est constant ($p < 0,001$). L'expérience montrée est représentative de 4 expérimentations indépendantes, présentant un taux d'inhibition suffisant (-56% en moyenne) et une sécrétion typique pour les cellules contrôles (croissance constante de l'activité sécrétrice avec l'accroissement de [Ca²⁺]_i).

Nos observations résumées en Figure 52 indiquent une absence de différence significative entre les effets inhibiteurs de Rab3aQ81L observés pour différentes concentrations de Ca²⁺ libre (de 0,1 à 100 μM), suggérant que Rab3aQ81L ne modifie pas la sensibilité de la machinerie d'exocytose au Ca²⁺, au moins sur des temps de stimulations longs. Cette apparente contradiction avec les données obtenues chez l'aplysie notamment est discutée plus loin.

III.D.4. Rab3a :GTP inhibe préférentiellement la phase de l'exocytose dépendante de l'ATP.

Un autre point que nous avons testé est l'effet de Rab3aQ81L sur 2 phases de la sécrétion distinguées par leur dépendance vis-à-vis de l'ATP. Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'étape de maturation fonctionnelle des VS/GS pour la fusion requiert de faibles concentrations de Ca²⁺ et la présence d'ATP. L'ATP serait nécessaire à la dissociation

des complexes SNAREs en *cis* par NSF, et à la production de phosphoinositides par les PI4K et PI5K, notamment.

Nous avons mesuré l'inhibition par Rab3aQ81L sur l'activité sécrétrice de cellules PC12 perméabilisées en présence ou en l'absence d'ATP (Figure 53).

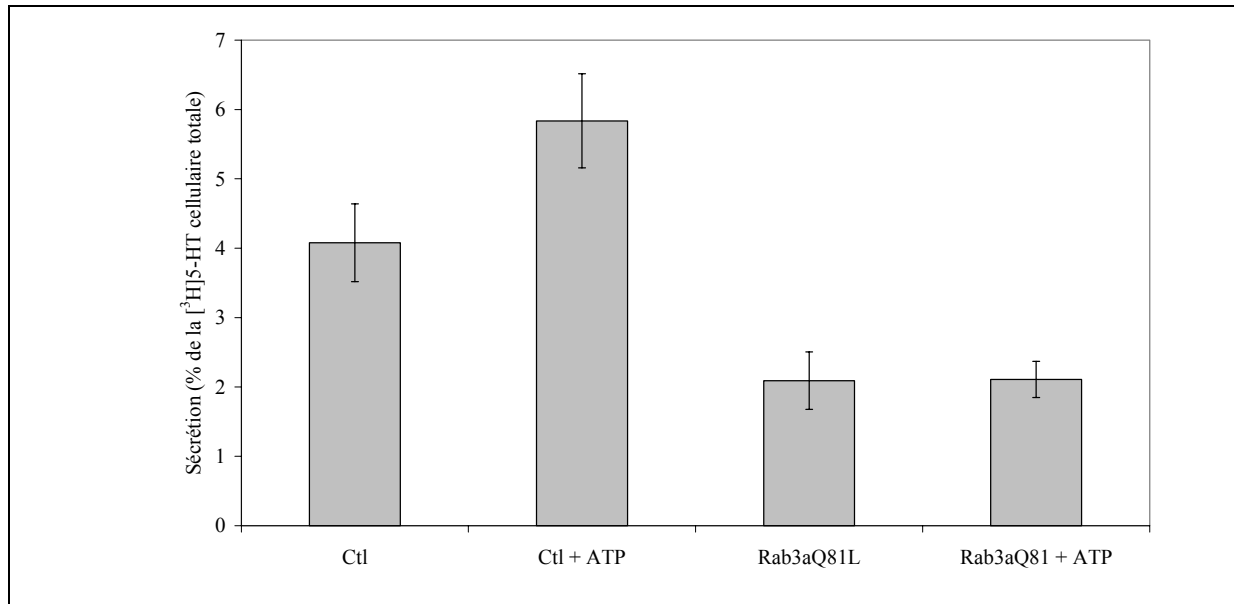


Figure 53

Effet de Rab3aQ81L sur la phase dépendante de l'ATP (amorçage) de la sécrétion. La capacité sécrétrice de cellules cotransfectées avec pCMV-SERT+pEGFP (Ctl) ou pCMV-SERT+pcDNA3Rab3aQ81L (Rab3aQ81L) est déterminée après incubation en présence de [³H]5-HT. L'exocytose est stimulée par application d'une solution extracellulaire contenant 30 μM de Ca²⁺ libre sur les cellules préalablement perméabilisées par de la digitonine (10 μM). Dans les cellules contrôles, l'adjonction d'ATP (2 mM) provoque un accroissement d'activité sécrétrice (155±17% de la condition sans ATP, moyenne ± ES, n=4) ; dans les cellules exprimant Rab3aQ81L, cette composante est abolie (76±13% de la condition sans ATP, moyenne ± ES, n=4, soit significativement différente des contrôles ; p=0,01, T-test) traduisant une totale inhibition de la phase d'amorçage (priming) par Rab3:GTP. L'expérimentation montrée est représentative de la moyenne des 4 expériences conduites.

Dans les cellules contrôles, la présence d'ATP (2 mM) pendant la phase de perméabilisation par la digitonine (5 minutes, en absence de Ca²⁺ libre) et la période de stimulation de la sécrétion (5 minutes, 30 μM de Ca²⁺ libre) accroît la capacité sécrétrice des cellules d'environ 50%, probablement en permettant la maturation fonctionnelle d'un certain nombre de GS. À l'inverse, dans les cellules exprimant Rab3aQ81L, ce "bonus" à la sécrétion est totalement aboli.

III.D.5. Discussion

Nous avons entrepris de mieux caractériser l'étape (ou les étapes) qui serai(en)t contrôlée(s) par Rab3. Résumons les données présentées précédemment :

Nos données cinétiques sur l'effet de Rab3aQ81L montrent que l'inhibition est plus prononcée sur les temps courts de sécrétion (premières dizaines de secondes) ; pour des temps plus longs, le taux de sécrétion semble se normaliser progressivement. Cet effet différentiel de Rab3aQ81L sur les temps courts et longs de sécrétion a été signalé par le groupe de Ian Macara (Holz *et al.*, 1994), par le biais du test de sécrétion de hGH dans des cellules chromaffines bovines exprimant Rab3aQ81L. Nos propres données sont plus résolutive dans le temps, et montrent une inhibition sélective de la phase initiale de la réponse sécrétrice par Rab3aQ81L, ainsi qu'un retard considérable à initier la sécrétion, suggérant une diminution du nombre de granules libérables. En accord avec les résultats récents des groupes de Jahn et Südhof (Schluter *et al.*, 2002), nous ne voyons aucune modification dans la force de l'inhibition de Rab3aQ81L lors de variations importantes de $[Ca^{2+}]_i$. Enfin, nous observons une inhibition totale par Rab3aQ81L de la composante de la sécrétion dépendante de l'ATP. Dans ce qui suit, nous essayons de discuter les différentes hypothèses qui peuvent rendre compte du changement observé du nombre de vésicules libérables.

Selon le schéma présenté dans la Figure 55, une diminution du nombre de vésicules libérables peut être due à une augmentation basale (en l'absence de stimulus) de l'exocytose ou à un changement de l'équilibre entre pool de réserve et pool libérable (diminution de l'arrimage ou de l'amorçage, ou augmentation du « désamorçage » (K_{-1})).

III.D.5.a. Augmentation de la libération basale

Pour rendre compte de l'effet inhibiteur de Rab3:GTP sur la sécrétion, Schlüter et coll. ont proposé une hypothèse intéressante et nouvelle : Rab3:GTP augmenterait la libération basale. Ils appuient cette proposition sur l'apparente augmentation de la libération de hGH dans le milieu de culture, après transfection de Rab3Q81L (Schluter *et al.*, 2002).

En fait, si nous réexaminons les données présentées dans cette étude, nous déduisons que la quantité de hGH sécrétée durant cette période est à peu près identique (en valeur absolue) à celle qui est sécrétée dans les conditions contrôles, et que seule la fraction relative

est augmentée. Peut-on en conclure comme ces auteurs que Rab3aQ81L convertit la sécrétion régulée en sécrétion constitutive ?

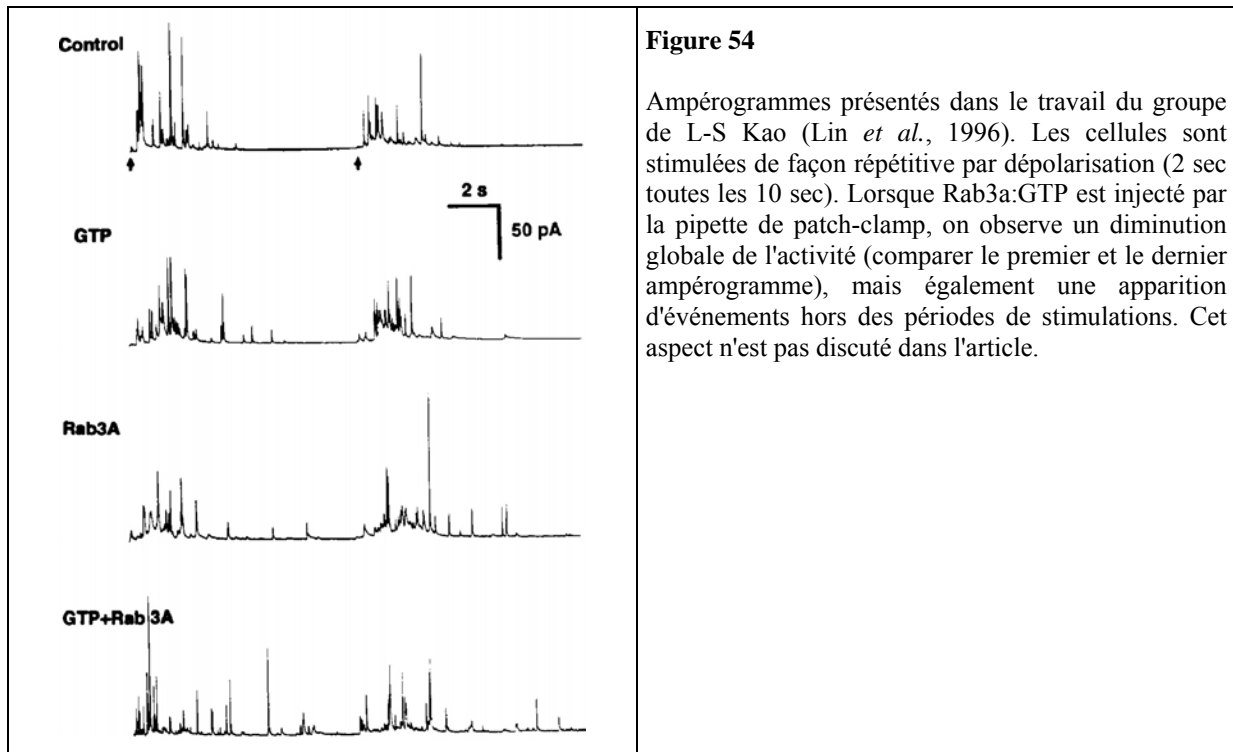
Nous avons tenté de reproduire ces résultats. Le test de sécrétion de la [³H]5-HT ne semble pas adéquat pour mener cette étude, en raison de la fuite vésiculaire déjà discutée. Une augmentation de la quantité de [³H]5-HT libérée sur de longues périodes ne peut pas être interprétée de façon non ambiguë comme une augmentation de la libération basale. Nous avons donc adopté la même technique que les auteurs, à savoir la libération de hGH. Dans 4 expériences, nous n'observons aucune augmentation de la fraction libérée de hGH, et nous observons toujours un effet inhibiteur sur la sécrétion au terme de 3-4 jours d'expression.

De plus, après une charge de cellules PC12 exprimant Rab3aQ81L en [³H]5-HT, nous observons de manière très reproductible un accroissement de la quantité de [³H]5-HT capturée par ces cellules ($+32 \pm 5\%$, moyenne \pm ES, n=23). Le même accroissement de la quantité de [³H]5-HT est reproduit ($+36 \pm 8\%$, moyenne \pm ES, n=4) dans des cellules PC12 exprimant le fragment catalytique de la neurotoxine botulique C1, qui inhibe fortement la sécrétion en clivant le complexe SNARE ($-58 \pm 4\%$, moyenne \pm ES, n=4). Ceci suggère que l'augmentation de capture de [³H]5-HT reflète un accroissement de la quantité de GS dans la cellules, consécutive à l'inhibition de leur libération.

Peut-on totalement réfuter cette hypothèse au regard d'autres données de la littérature ? Le point avancé dans cette étude pour l'observation de l'effet inhibiteur à "long terme" est la présence de Rab3:GTP plusieurs jours avant la mesure de la sécrétion. Qu'en est-il dans des systèmes où la protéine mutante est directement introduite dans les cellules au moment de l'expérimentation ? Relativement peu d'études utilisent cette approche.

Dans l'une des études menées au laboratoire, L. Johannes et coll. observaient un effet inhibiteur sur la sécrétion de cellules chromaffines bovines après injection du mutant Rab3aQ81L produit sous forme recombinante (Johannes *et al.*, 1994). Dans cette étude, un effet inhibiteur sur la sécrétion était observé 3 à 24 heures après la microinjection. Dans ce même système, la perfusion de Rab3:GTP par la pipette de patch servant à dépolariser les cellules induit en revanche très rapidement (5-10 minutes) une inhibition de la sécrétion, mesurée par ampérométrie (Lin *et al.*, 1996). Cela suggère que l'effet inhibiteur de

Rab3a:GTP se développe très rapidement, hypothèse peu compatible avec l'épuisement du pool libérable dû à une augmentation de la libération basale. En examinant attentivement les ampérogrammes présentés dans ce travail, on remarquera néanmoins que l'injection de Rab3a:GTP semble s'accompagner d'une augmentation de l'activité sécrétrice entre 2 épisodes de stimulation (voir Figure 54). Cet aspect n'est pas évoqué dans ce travail, et il est difficile de dire si cette figure (observation de 2 ampérogrammes) reflète une tendance générale.



Dans les autres études où le rôle de Rab3 a été étudié par une approche d'injection de protéines recombinantes, il est difficile d'exclure totalement l'hypothèse d'un effet activateur primaire de Rab3aQ81L sur la sécrétion, menant à l'observation secondaire d'une inhibition par déplétion du pool libérable. En effet, l'injection de Rab3aQ81L dans la terminaison de neurones cholinergiques du ganglion buccal de l'aplysie s'accompagne d'un développement rapide d'une inhibition de la libération d'ACh (quelques dizaines de minutes, Johannes *et al.*, 1996; Doussau *et al.*, 1998). Cependant, l'activité sécrétrice de ces neurones n'est testée que toutes les 60 secondes, par le biais de la réponse de neurones post-synaptiques. Il n'est pas impossible, même si nous estimons cela improbable, que Rab3aQ81L ait un effet activateur sur la sécrétion en l'absence de stimulation (i.e. durant des périodes où l'activité post-synaptique n'est pas mesurée). De plus, si l'inhibition mesurée était due à une diminution du

nombre de vésicules libérables (effet N), l'application de trains de stimuli devrait aggraver le défaut de libération. Or, le contraire est observé.

Dans les cellules chromaffines microinjectées avec des oligonucléotides antisens dirigés contre Rab3a, on observe une augmentation de la réponse lors de dépolarisations successives et une augmentation de l'affinité apparente de l'exocytose pour le calcium (mesurée par capacité membranaire et dialyse du cytosol avec des solutions à teneur variable en calcium via la pipette de patch ; Johannes *et al.*, 1994; Johannes *et al.*, 1998). Ces expériences montrent un effet " K_m " (réponse semi-maximale à $[Ca^{2+}] = 0.2 \mu M$ (antisens) et $1 \mu M$ (témoins), avec une forte coopérativité dans la condition antisens) mais pas d'effet " V_{max} " (même réponse à $[Ca^{2+}] = 10 \mu M$). Or, si Rab3 diminuait N (par exocytose constitutive), les antisens auraient du avoir un effet sur V_{max} , mais pas sur K_m .

Les arguments avancés par les groupes de Südhof et Jahn pour un effet activateur de Rab3a:GTP sur la sécrétion nous semblent donc insuffisants. Cependant, on doit se rappeler que Rab3:GTP semble avoir des effets activateurs dans certains systèmes, comme les cellules lactotropes et gonadotropes de l'antéhypophyse (Rab3b, Lledo *et al.*, 1993; Tasaka *et al.*, 1998), la réaction acrosomique (Michaut *et al.*, 2000; Yunes *et al.*, 2000; De Blas *et al.*, 2002; Yunes *et al.*, 2002) ou encore le KO chez le nématode (Nonet *et al.*, 1997). Le travail du groupe de Mayorga sur le rôle de Rab3 dans la fusion acrosomique suggère aussi un rôle facilitateur de Rab3aQ81L dans l'exocytose, par un mécanisme peu abordé ailleurs, la mobilisation des stocks intracellulaires de Ca^{2+} . En effet, l'acrosome contient d'importantes quantités de Ca^{2+} , tout comme les GS et les VS. Le beau travail de ce groupe suggère que Rab3a:GTP stimule la libération du Ca^{2+} acrosomique, entraînant la fusion de l'acrosome avec la membrane plasmique du spermatozoïde.

Un indice cohérent pour un rôle de Rab3 dans la régulation de la libération de stocks de Ca^{2+} intracellulaires est l'interaction du fragment non catalytique de la GAP de Rab3 (p150-Rab3GAP) avec les récepteurs de l'IP3 du réticulum endoplasmique (Randen Patterson, communication personnelle), qui jouent un rôle majeur dans la libération de Ca^{2+} depuis cet organelle. Nos expérimentations préliminaires sur l'implication de Rab3 dans la libération du Ca^{2+} des stocks intracellulaires sont pour le moment restées infructueuses, mais cette voie

semble prometteuse, et sa compréhension permettrait peut-être de réconcilier l'ensemble des données disponibles sur le rôle de Rab3 dans la sécrétion régulée.

III.D.5.b. Effet de Rab3 sur l'arrimage

Une inhibition de l'arrimage pourrait expliquer la diminution de *N* observée après expression de Rab3aQ81L. Cependant, plusieurs données de la littérature indiquent au contraire que Rab3 favorise l'étape d'arrimage.

Ainsi, l'expression de Rab3a sauvage augmente le nombre de GS morphologiquement arrimés à la membrane plasmique, tandis que le mutant Rab3aN135I réduit ce pool (Martelli *et al.*, 2000). L'effet de la mutation N135I est cependant à considérer avec précaution, dans la mesure où ce mutant est en fait incapable de lier les nucléotides et est probablement déstructuré dans la cellule. Le groupe de P. Novick a d'ailleurs montré que des Rab non liées aux nucléotides pouvaient interagir avec des syntaxines (Grote *et al.*, 1999). Ainsi, l'effet drastique de ce mutant sur l'arrimage (et la sécrétion, voir Johannes *et al.*, 1994) pourrait passer par une interaction avec la syntaxine, qui limiterait son engagement dans des complexes SNAREs en *trans*. Il reste à déterminer si cela traduit une réelle fonction physiologique de Rab3, ce que suggèrent les travaux récents du groupe de F. Benfenati (voir III.C.4.g).

Un rôle positif sur l'arrimage est aussi suggéré par les résultats du groupe de Verhage, montrant un défaut de recrutement de VS à la zone active entre deux stimulations (Leenders *et al.*, 2001), et par ceux de Nonet et coll. qui montrent une diminution du nombre de VS à proximité des zones actives (Nonet *et al.*, 1997).

Un effet de Rab3 dans l'arrimage pourrait avoir un mécanisme analogue à celui de Sec4p et de Ral, qui interagissent avec l'exocyste. Il a d'ailleurs été montré récemment que Ral pouvait participer à la régulation de la taille du pool libérable, d'une manière dépendant du Ca²⁺ (Polzin *et al.*, 2002).

III.D.5.c. Effet de Rab3 sur l'amorçage

Une possibilité que suggèrent nos résultats, et qui est compatible avec un certain nombre de données dans la littérature serait que Rab3aQ81L inhibe l'étape de maturation, ou amorçage. Cette proposition n'est d'ailleurs pas incompatible avec un effet 'positif' sur l'arrimage.

Ainsi, quasiment aucun événement ampérométrique n'est observé durant les 5 premières secondes de la sécrétion dans les cellules chromaffines exprimant Rab3aQ81L, alors qu'on observe en moyenne une vingtaine de pics pour les cellules contrôles dans le même intervalle (voir Figure 50, Figure 51 et Tableau 10). L'effet inhibiteur de Rab3aQ81L sur la composante dépendante de l'ATP cadre aussi avec cette hypothèse, et les données obtenues avec les antisens (Johannes *et al.*, 1994; Johannes *et al.*, 1998) et dans les neurones cholinergiques de l'aplysie (Johannes *et al.*, 1996; Doussau *et al.*, 1998) sont aussi compatibles avec cette interprétation.

Nos résultats montrent que l'effet de Rab3a diminue, voire s'annule au cours du temps. Cette observation peut indiquer que l'inhibition exercée par Rab3 soit levée lors de la stimulation. Cette proposition semble intéressante, car elle rappelle les résultats déjà mentionnés sur le lien fonctionnel qui existe entre l'activité de Rab3 et la sensibilité au calcium du phénomène exocytotique. Cependant, nos résultats montrent aussi que l'effet de Rab3aQ81L n'est pas sensiblement modifié par une élévation de Ca^{2+} libre (dans une large gamme de 0,1 à 100 μ M), ce qui est confirmé par les travaux récents des groupes de Jahn et Südhof (Schluter *et al.*, 2002). Il faut néanmoins rester prudent lorsque l'on rapproche les données des différentes études, et tenter de séparer la sensibilité de la machinerie de libération de l'éventuelle sensibilité de l'efficacité de Rab3 au Ca^{2+} .

Une deuxième possibilité serait un 'masquage' de l'effet de Rab3 dans des conditions (de stimulation prolongée) où d'autres facteurs ou étapes du processus sécrétoire, deviendraient limitants.

Enfin, Rab3:GTP pourrait stimuler l'étape inverse, le désamorçage (unpriming). L'incapacité à maintenir les vésicules dans un état libérable aurait effectivement un effet inhibiteur sur la réponse à des stimuli brefs (qui mesurent N au repos) mais pas à des stimuli longs (qui mesurent la vitesse de remplissage du pool libérable).

Quel serait le mécanisme moléculaire de l'effet de Rab3 sur l'amorçage (ou le désamorçage) ? Une possibilité serait l'interaction de Rab3 avec RIM, présent à la membrane plasmique. Nous avons vu, en effet, que plusieurs études conduites chez la souris (Betz *et al.*, 2001; Castillo *et al.*, 2002) et le nématode (Koushika *et al.*, 2001) indiquent un rôle de RIM

dans l'amorçage en coordination avec Munc13. L'interaction de Rab3:GTP avec RIM pourrait entrer en compétition avec la liaison de RIM à Munc13, et interférer ainsi avec le priming.

Les données du groupe d'U. Blank indiquent que Rab3 peut recruter une kinase (Rak3D) capable de phosphoryler la syntaxine. De plus, cette modification de la syntaxine interfère avec sa liaison à SNAP-23 (Pombo *et al.*, 2001). Ainsi, l'activation de Rak3D pourrait inhiber la formation du complexe SNARE et donc l'étape d'amorçage (ou de désamorçage).

La découverte de Rak3D suggère aussi une explication alternative aux résultats obtenus sur l'effet de protecteur de Rab3Q81L vis-à-vis de l'action des toxines clostridiales. Rab3Q81L retarde l'action de la toxine tétanique et de la toxine botulique A, un effet qui avait été attribué à une augmentation de la quantité de complexes *trans* (Johannes *et al.*, 1996). L'insensibilité de ces complexes aux toxines n'est cependant pas démontrée. La phosphorylation des protéines SNARE pourrait interférer avec le clivage induit par les toxines clostridiales. Si tel était le cas, les effets de Rab3 sur l'action des toxines et sur la phase d'amorçage pourraient avoir une cause commune : la phosphorylation des SNARE.

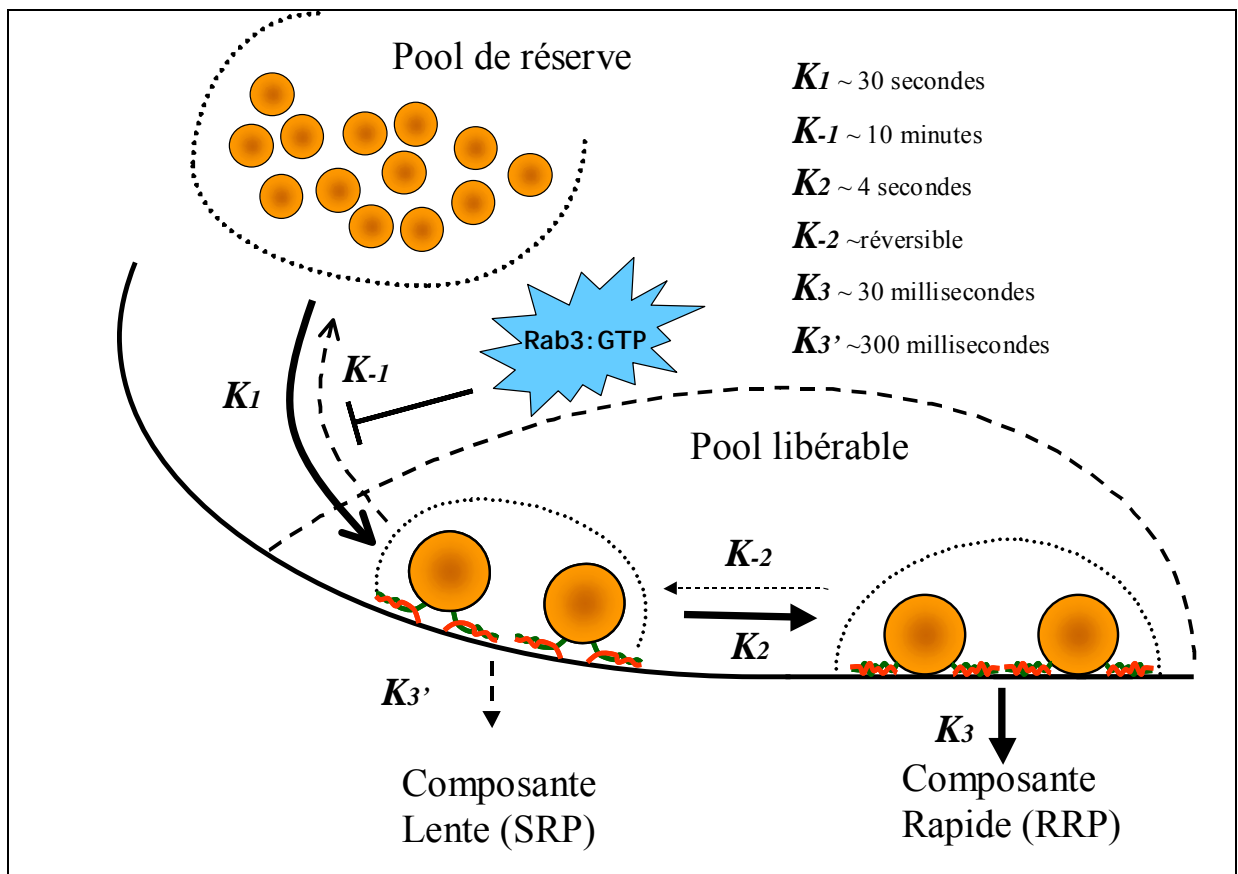


Figure 55

Une proposition pour le point d'action de Rab3aQ81L dans la sécrétion des NT. Les différents arguments (cinétiques, morphologiques) semblent indiquer un rôle double de Rab3a:GTP dans le processus sécrétoire. Il semble que Rab3 soit nécessaire au recrutement d'un pool de vésicules à la membrane plasmique. En revanche, Rab3:GTP diminuerait l'efficacité de la phase d'amorçage (priming), soit en inhibant l'amorçage (K_1), soit en augmentant le désamorçage (K_{-1}).

III.E. MyRIP et les protéines Rab27

III.E.1. Caractérisation de MyRIP, un nouvel effecteur de Rab27

III.E.1.a. Maladies génétiques associant surdité et dégénérescence de la pigmentation rétinienne

Le groupe de Christine Petit (Institut Pasteur) s'attache à l'étude des mécanismes moléculaires de certains déficits sensoriels d'origine génétique chez l'homme, comme le syndrome de Usher-1B. La collaboration entre le groupe de C. Petit et notre équipe a permis d'identifier MyRIP, une protéine nouvellement caractérisée par nos collaborateurs, comme un effecteur de Rab27, et non de Rab3. Ma contribution à l'article publié dans *EMBO Reports* résultant de cette collaboration n'a pas été majeure. C'est pourquoi je ne discuterai pas de manière détaillée les résultats figurant dans cette publication. Je l'inclus néanmoins dans ce manuscrit avant la partie consacrée à Rab27, car il présente les raisons pour lesquelles nous nous sommes intéressés au rôle de cette GTPase dans l'exocytose régulée. J'inclus également une courte introduction sur le contexte clinique de l'étude entreprise par nos collaborateurs au début de ce chapitre.

III.E.1.a.i. Le syndrome de Usher

Le premier cas décrit de ce syndrome le fut probablement en 1858 par von Graefe, qui relate l'examen d'un patient atteint de surdi-mutité, d'une dégénérescence de la pigmentation rétinienne et dont 2 frères partageaient les symptômes. Des cas similaires dans la population Berlinoise furent par la suite décrits par Liebreich en 1861. Ces observations furent les premières à décrire la co-hérédité d'une dégénérescence de la pigmentation rétinienne et la surdi-mutité. Ce syndrome fut finalement désigné d'après le nom de Charles Usher, un ophtalmologiste anglais qui décrivit également les caractéristiques de la transmission de cette affection en 1914.

En fait, le syndrome de Usher, dont la prévalence dans les populations européennes est d'environ 3-4/100.000 naissances, présente plusieurs formes cliniques classées en 3 catégories

principales (USH1, 2 et 3), elles-mêmes subdivisées, si bien qu'on distingue en fait 12 variantes du syndrome de Usher. Cette catégorisation clinique, basée sur la gravité des troubles et l'âge d'apparition des premiers symptômes, reflète en fait une hétérogénéité des loci impliqués dans la maladie. Un locus distinct est affecté dans chaque forme du syndrome, et 6 gènes sont pour l'heure caractérisés.

Ainsi, 75% des patients atteints du syndrome USH1 présentent des mutations du gène MYO7A (syndrome USH1B), codant la myosine-7a. Les autres gènes caractérisés pour l'heure codent les protéines harmonine (USH1C), otocadhérine (USH1D), protocadhérine 15 (USH1F) et usherine (USH2). Le gène responsable de la forme USH3 est identifié, mais la fonction de la protéine codée est totalement inconnue.

Le groupe de C. Petit, en voulant caractériser certains acteurs moléculaires impliqués dans ce syndrome, s'est particulièrement intéressé au rôle de la myosine-7a, et à la recherche de ses partenaires cellulaires. La myosine-7a (*myo7a*), une myosine non conventionnelle, i.e. ne s'associant pas en filaments, a été localisée dans les cils connecteurs des photorécepteurs et dans les microvilli de l'épithélium pigmentaire rétinien. Au niveau de l'oreille interne, elle est trouvée exprimée dans le neuroépithélium vestibulaire et dans les cellules cochléaires.

Les souris *shaker-1* déficientes pour la myosine-7a constituent un modèle animal du syndrome USH1B. Chez ces animaux, les stéréocils des cellules l'oreille interne, qui assurent la partie mécanoréceptrice de l'audition, dégénèrent rapidement après la naissance, et le développement de l'organe de Corti est retardé. Dans la rétine, les pigments de l'épithélium pigmentaire adoptent une localisation aberrante, mais aucun signe de dégénérescence rétinienne n'est observé (Liu *et al.*, 1998b) contrairement aux symptômes des patients atteints par USH1B. Cependant, chez la souris et contrairement à l'homme, la myosine-7a n'est pas présente dans les cellules photoréceptrices, ce qui suggère que la rétinite pigmentaire ait son origine dans les bâtonnets (Espinosa *et al.*, 1998).

Le groupe de Christine Petit s'est attaché à découvrir des partenaires d'interaction de la myosine-7a, afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires menant aux pathologies associées au syndrome de Usher. Par une approche de double hybride, ce groupe a identifié une protéine nouvelle, MyRIP, capable de lier la myosine-7a. L'article suivant décrit la découverte de MyRIP, et sa caractérisation en tant qu'effecteur de Rab27.

MyRIP, a novel Rab effector, enables myosin VIIa recruitment to retinal melanosomes

Aziz El-Amraoui, Jean-Sébastien Schonn¹, Polonca Küssel-Andermann, Stéphane Blanchard, Claire Desnos¹, Jean-Pierre Henry¹, Uwe Wolfrum², François Darchen¹ & Christine Petit⁺

Unité de Génétique des Déficiences Sensoriels, CNRS URA 1968, Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, F-5724 Paris cedex 15, ¹CNRS UPR 1929, Institut de Biologie Physico-Chimique, 13 rue Pierre et Marie Curie, F-5005 Paris, France and ²Institut für Zoologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, D-55099 Mainz, Germany

Received January 1, 2002; revised and accepted March 1, 2002

Defects of the myosin VIIa motor protein cause deafness and retinal anomalies in humans and mice. We report on the identification of a novel myosin-VIIa-interacting protein that we have named MyRIP (myosin-VIIa- and Rab-interacting protein), since it also binds to Rab27A in a GTP-dependent manner. In the retinal pigment epithelium cells, MyRIP, myosin VIIa and Rab27A are associated with melanosomes. In transfected PC12 cells, overexpression of MyRIP was shown to interfere with the myosin VIIa tail localization. We propose that a molecular complex composed of Rab27A, MyRIP and myosin VIIa bridges retinal melanosomes to the actin cytoskeleton and thereby mediates the local trafficking of these organelles. The defect of this molecular complex is likely to account for the perinuclear mislocalization of the melanosomes observed in the retinal pigment epithelium cells of myosinVIIa-defective mice.

INTRODUCTION

Mutations in the *MYO7A* gene, encoding myosin VIIa, cause auditory and retinal defects in mice and humans (for a review, see Petit, 2001). The primary structure of myosin VIIa is highly conserved between vertebrates and invertebrates, with a motor head domain, a neck region composed of five IQ (isoleucine-glutamine) motifs, and a long tail region [1359 amino acids (aa) in man]. The tail begins with a dimerization domain, followed by two large repeats of ~460 aa, each containing a myosin tail homology 4 (MyTH4) and a 4.1, ezrin, radixin, moesin (FERM) domain, separated by a src homology type 3 (SH3) domain (Petit, 2001).

The myosin-VIIa-defective *shaker-1* mice are characterized by a progressive disorganization of the hair cell stereocilia,

i.e. the stiff actin-filled microvilli forming the mechanoreceptive structure to sound stimulation (Self *et al.*, 1998). In the retina of *shaker-1* mice, melanosomes of the pigment epithelium cells are abnormally concentrated in the perinuclear region (Liu *et al.*, 1998), and opsin transport in the photoreceptor cells is delayed (Liu *et al.*, 1999; Wolfrum and Schmitt, 2000). Together, these observations point to the existence of several different roles for this unconventional myosin.

To gain insight into the cellular functions of myosin VIIa, we searched for proteins interacting with the myosin VIIa tail using the yeast two-hybrid system (Kussel-Andermann *et al.*, 2000a). We report here that myosin VIIa binds to a novel Rab effector protein that directly interacts with Rab27A, a Rab GTP-binding protein involved in the trafficking of skin melanosomes (for a review, see Marks and Seabra, 2001).

RESULTS

To identify proteins interacting with the tail of myosin VIIa, the C-terminal MyTH4 and FERM domains of the protein (last 464 aa) were used as the bait to screen a human retinal two-hybrid cDNA library (Kussel-Andermann *et al.*, 2000a). A prey composed of 418 aa encoded by clone A7 was considered to be a specific ligand of myosin VIIa, since no interaction could be observed with two control proteins, namely lamin C and merlin/schwannomin (which also possesses a FERM domain; see Supplementary figure 1 available at *Embo reports* Online). Using the A7 cDNA as a probe, a 5.2 kb transcript was detected in most human and mouse tissues tested, namely brain, kidney, heart, liver, muscle and pancreas (data not shown). A full-length cDNA, A7FL (DDBJ/EMBL/GenBank accession No. AF396687), was reconstituted from a human retinal cDNA library (see

⁺Corresponding author. Tel: +33 1 45 68 88 50; Fax: +33 1 45 67 69 78; E-mail: cpetit@pasteur.fr

A. El-Amraoui et al.

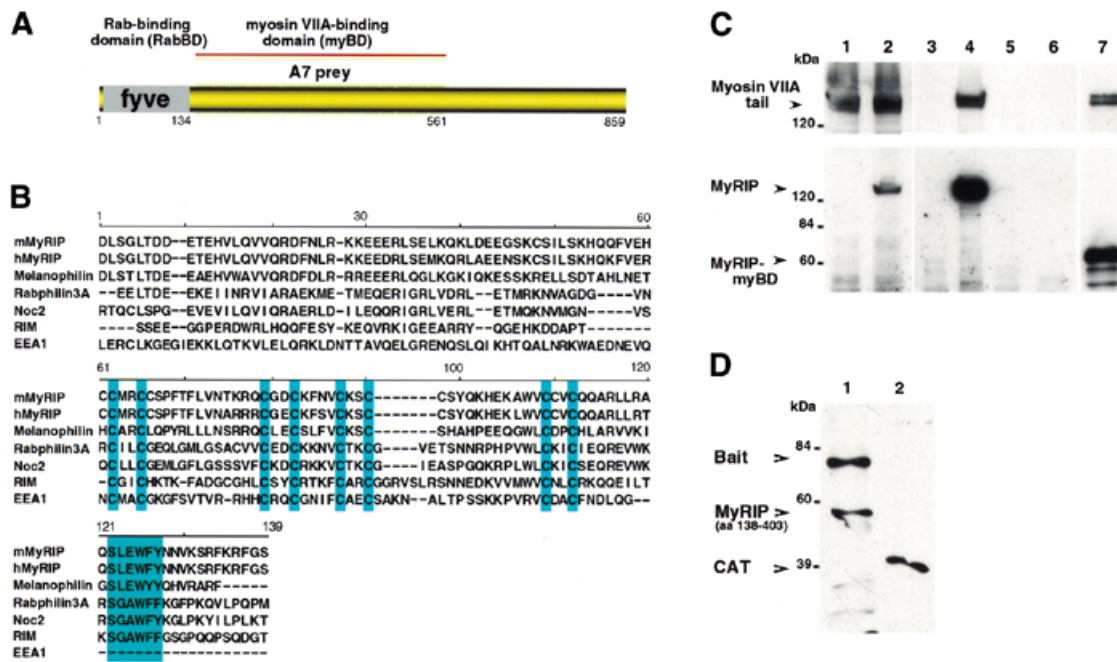


Fig. 1. MyRIP, a novel Rab effector that binds to myosin VIIa. **(A)** Structure of the MyRIP predicted protein. The N-terminal FYVE domain (Rab-binding domain) and the region corresponding to the A7 prey (i.e. binding to myosin VIIa) are indicated. **(B)** Clustal W sequence alignment of the FYVE domains of MyRIP and other Rab effectors. The eight conserved cysteine residues responsible for Zn²⁺ binding are indicated. The SGAWF(F/Y) motif that is involved in the binding of Rabphilin3A and Noc2 to Rab3A is shown. The MyRIP FYVE domain shows 50 and 30% aa identity with the Rab-binding domains of melanophilin and Rabphilin3A, respectively. **(C)** Immunoprecipitation experiment. Lane 1 contains soluble protein extract from HEK293 cells producing the myosin VIIa tail alone. Extracts from cotransfected HEK293 cells producing both the myosin VIIa tail and myc-MyRIP (lane 2) were used for immunoprecipitations (lanes 3 and 4). The two proteins are coprecipitated by the anti-hA7 MyRIP antibody (lane 4) but not by the corresponding preimmune serum (lane 3). Extracts from untransfected cells (lane 5) and from cells expressing the myosin VIIa tail alone (lane 6) were used as negative controls for the immunoprecipitation experiment with the anti-hA7 antibody. The myosin VIIa tail coprecipitated also with MyRIP-myBD, using the anti-hA7 antibody (lane 7). The mouse anti-myosin-VIIa (anti-SSI) and anti-myc (9E10) mouse monoclonal antibodies were used to detect the myosin VIIa tail (top), and the myc-MyRIP and myc-MyRIP-myBD (bottom), respectively. **(D)** *In vitro* binding assay. The bait (lane 1) and chloramphenicol acetyltransferase (CAT, lane 2)-bound resins were incubated with bacterial extracts containing a MyRIP fragment corresponding to aa 138–403. Only the bait binds to the MyRIP fragment. Horseradish-peroxidase-conjugated streptavidin was used to detect biotinylated proteins.

Methods). The deduced amino acid sequence predicts a 859 aa (96 kDa) protein (Figure 1A), hereafter named MyRIP (myosin-VIIa- and Rab-interacting protein) based on functional considerations (see below).

Sequence analysis of MyRIP revealed the existence of an N-terminal FYVE (Fab1p, YOTB, Vac1P, EEA1) domain (Figure 1A and B). The MyRIP FYVE domain, which is highly conserved between the human and murine proteins (95% aa identity), possesses the eight conserved cysteine residues (Figure 1B) that are known to coordinate the binding to two Zn²⁺ ions. Homology search analysis revealed an homology between the MyRIP FYVE domain and the Rab3-binding domain of Rabphilin3A, Rim and Noc2; and with the Slp homology domain (SHD) of two members of the synaptotagmin-like protein (Slp) family, Slp2 and Slp3 (30% aa identity), and Slac2a/melanophilin (50% aa identity; Figure 1B). The crystal structure of the Rabphilin3A FYVE domain complexed to Rab3A (Ostermeier and Brünger, 1999) has highlighted the involvement of a motif, SGAWF(F/Y), in the interaction with Rab3A (Figure 1B). Interestingly, a similar, although not identical, motif (SLEWFY) is present in MyRIP (Figure 1B). Accordingly, the MyRIP amino acid sequence can be subdivided into three regions, the N-terminal FYVE domain (aa 1–134), the myosin-VIIa-binding

region (myBD, aa 143–560) and the C-terminal region (aa 561–859).

In order to confirm the interaction between myosin VIIa and MyRIP, HEK293 mammalian cells were cotransfected with constructs encoding the myosin VIIa tail and either the full-length MyRIP or the MyRIP-myBD truncated form. Coimmunoprecipitation of the myosin VIIa tail with either MyRIP or MyRIP-myBD (Figure 1C) was demonstrated on cell extracts incubated with an anti-MyRIP antibody (anti-hA7; see Methods). Furthermore, in a pull-down experiment, the myosin VIIa tail bound to the GST-tagged MyRIP-ΔCt (aa 1–561) fragment but not to GST alone (data not shown). In addition, an *in vitro* binding assay demonstrated a direct interaction between the 464 aa tail fragment of myosin VIIa corresponding to the original bait and a MyRIP fragment (Figure 1D). Taken together, these results demonstrate that MyRIP specifically binds to myosin VIIa.

The presence of a putative Rab-binding motif in the MyRIP sequence prompted us to search for Rab GTPases interacting with MyRIP. The interaction of different Rab proteins with immobilized GST-tagged MyRIP-RabBD, MyRIP-ΔCt or GST was measured by means of a filter binding assay. Significant bindings of Rab27A-GTP to MyRIP-RabBD and MyRIP-ΔCt were detected, as compared with immobilized GST (Figure 2A and B). Since Rab3 isoforms A, B, C and D, Rab4, Rab5, Rab6,

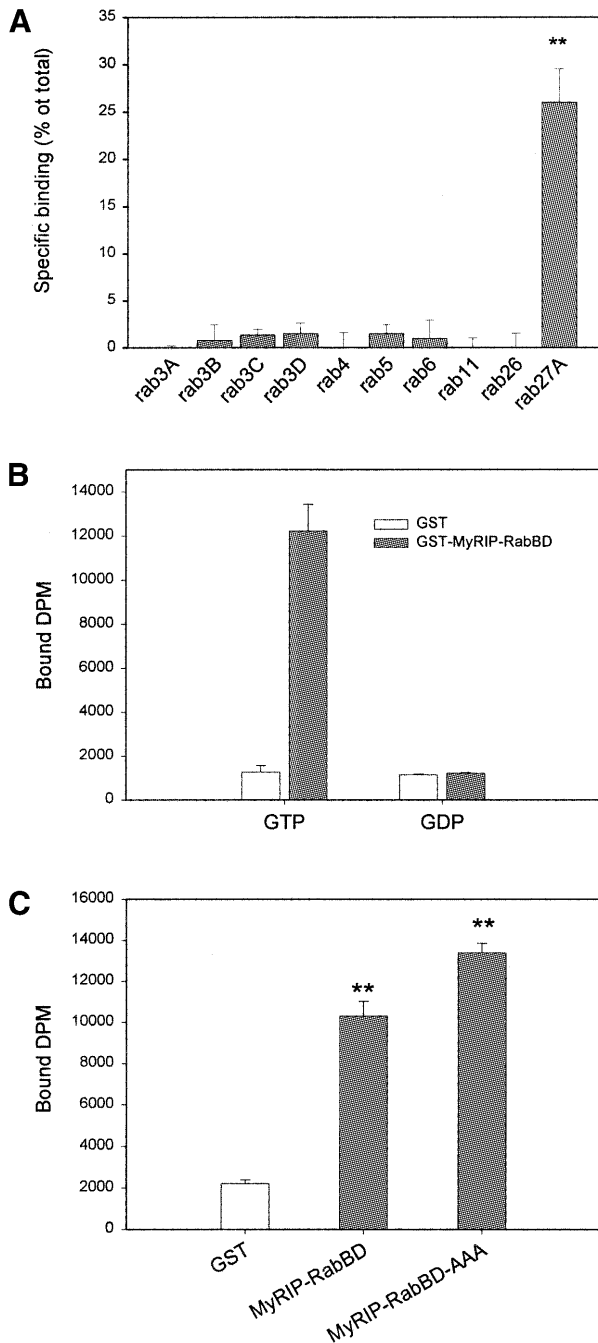


Fig. 2. MyRIP binds to Rab27A-GTP. (A) A filter binding assay was used to measure the binding of various Rab proteins to the GST-tagged MyRIP-RabBD. Non-specific binding to GST was subtracted. Only Rab27A binds to MyRIP-RabBD. (B) Recombinant Rab27A (80 nM) was loaded either with [³H]GTP or [³H]GDP and incubated with 150 pmol immobilized GST-MyRIP-RabBD (grey bars) or GST alone (white bars). Only GTP-bound Rab27A binds to MyRIP-RabBD. (C) Rab27A-GTP binds equally well to the mutated form MyRIP-RabBDAAA, carrying 3 aa substitutions in the SLEWYF motif. Data are shown as the percentage of the total radioactivity (mean ± SE, n = 3). ** indicates significant difference (p < 0.01) with the negative control GST.

Rab11 and Rab26 did not bind to MyRIP-RabBD (Figure 2A), the binding of Rab27A-GTP to MyRIP-RabBD was considered specific. This binding reached saturation, and a K_d of ~1 μ M was derived (data not shown). Furthermore, Rab27A-GDP did not bind to MyRIP-RabBD, indicating that MyRIP specifically interacts with the GTP-bound form of Rab27A (Figure 2B). MyRIP- Δ Ct exhibited no GTPase-activating protein (GAP) or guanine nucleotide exchange factor (GEF) activity (data not shown). The crystal structure of Rabphilin3A-Rab3A complex indicates that the SGAWFF motif (Figure 1B) constitutes one interface between Rabphilin3A and Rab3A molecules (Ostermeier and Brunger, 1999). Mutating this motif in Noc2 (SGAWFY to SGAAAA) impairs Noc2-Rab3A binding (Haynes *et al.*, 2001). In contrast, the mutation of the MyRIP SLEWYF motif to SLEAAA was not detrimental to the binding of MyRIP to Rab27A (Figure 2C).

Specific antibodies were generated against MyRIP (see Methods) and were used to analyse the distribution of the protein on mouse tissue sections. MyRIP was detected in a variety of tissues, including brain, skin, heart, adrenal medulla, pancreas, intestine, liver, kidney, muscle and testis (data not shown). The distribution of MyRIP was further analysed, using the anti-hA7 antibody, in the mouse inner ear and retina, i.e. the two target organs of the myosin VIIa defect in mice and humans. In the mouse inner ear, MyRIP was detected in the cochlear and vestibular hair cells, where it was colocalized with myosin VIIa in the synaptic region and along the hair cell bundle (data not shown). In the retina, MyRIP was present in the photoreceptor cells and pigment epithelium cells (Figure 3A), i.e. the two cell types where myosin VIIa has been detected (Hasson *et al.*, 1995; El-Amraoui *et al.*, 1996). In the photoreceptor cells, MyRIP was localized in the synaptic region. Ultrastructural analysis of MyRIP localization showed that the protein was present in both pre- and post-synaptic areas (data not shown). In the pigment epithelium cells, MyRIP and Rab27A were observed in the microvilli that surround the tips of the photoreceptor outer segments (Figure 3A and B; see Supplementary data). In addition, analysis of the subcellular distribution of MyRIP by immunoelectron microscopy showed the presence of gold particles on melanosomes (Figure 3C and D). Myosin VIIa (Figure 3E; Liu *et al.*, 1998) and Rab27A (Figure 3F) were also associated with retinal melanosomes.

Since MyRIP was present also in the synaptic areas of retinal photoreceptor cells (Figure 4A) and inner ear hair cells, we used the PC12 neuroendocrine cell line to determine whether MyRIP is able to recruit the myosin VIIa tail upon cotransfection. In differentiated PC12 cells producing GFP-myosin-VIIa tail, a punctate labelling of the cell body was observed, whereas the neurites were almost unstained (Figure 4A). In contrast, in PC12 cells expressing both the GFP-myosin-VIIa tail and myc-MyRIP, the myosin VIIa tail was enriched significantly at the tip of the neurites (Figure 4B). This enrichment appeared specific, since it was not observed upon cotransfection with a construct encoding either a MyRIP truncated form, lacking the Rab-binding protein, or the myc-tagged fruitfly luciferase (data not shown). We then examined the involvement of each of the three MyRIP regions in the protein targeting (Figure 4C). We found that, in PC12 cells expressing a MyRIP-RabBD construct, MyRIP-RabBD labelling was observed essentially at the tip of the neurites (Figure 4E, arrows), reminiscent of that observed in cells producing full-length MyRIP. In contrast, no such enrichment

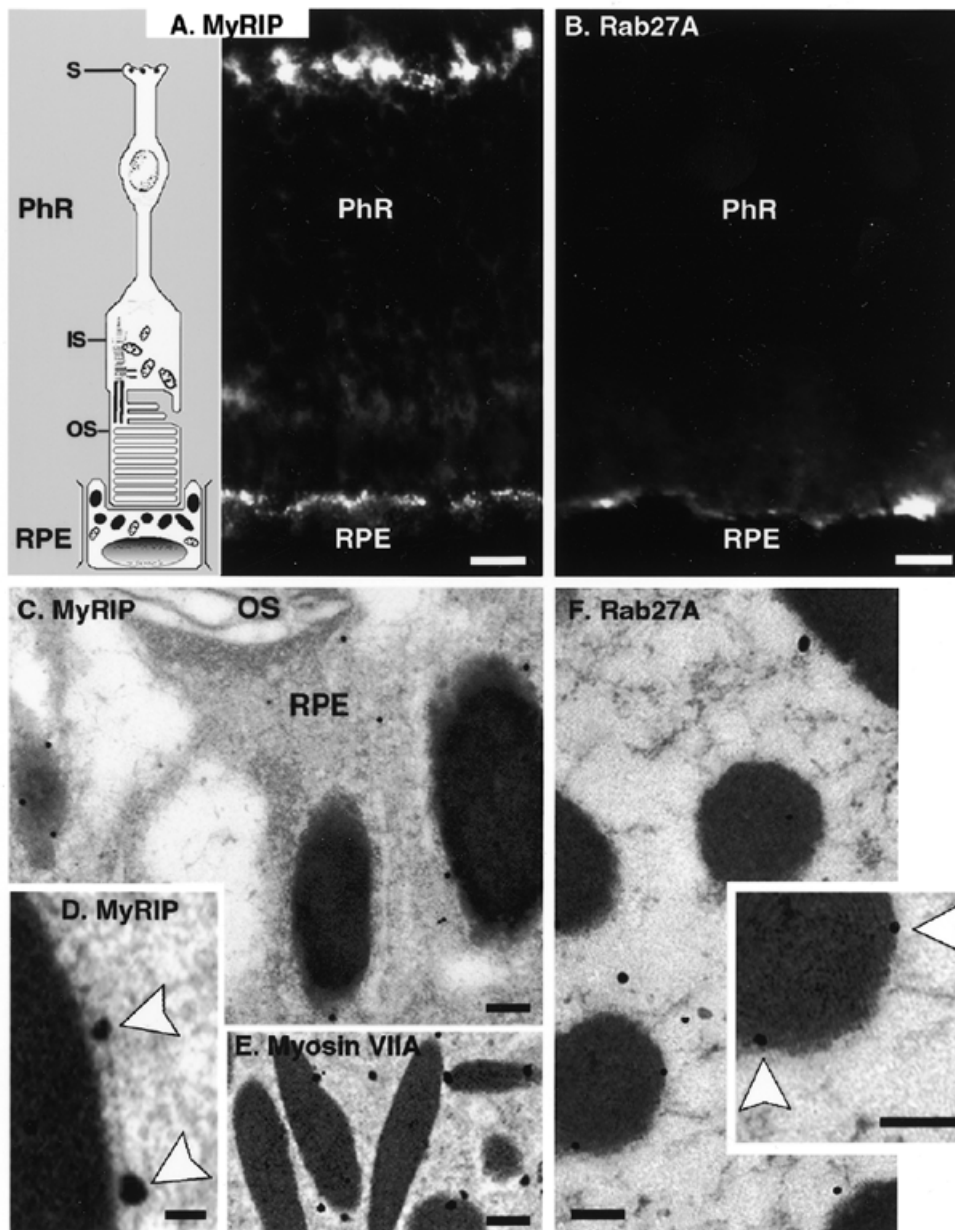


Fig. 3. Localization of MyRIP and Rab27A in the mouse retina. **(A)** MyRIP is detected at the synaptic region (S) of photoreceptor cells (PhR) and on the microvilli of retinal pigment epithelium (RPE) cells. **(B)** Rab27A is present on the microvilli of RPE cells. In RPE cells, MyRIP **(C and D)**, myosin VIIa **(E)** and Rab27A **(F)** silver-enhanced immunogold labellings are associated with the membrane of melanosomes. IS, inner segment; OS, outer segment. Scale bars: (A and B), 12 μ m; (C), 175 nm; (D), 100 nm; (E), 235 nm; (F and inset), 140 nm.

was observed at the tips of the neurites in cells producing either MyRIP–myBD, MyRIP– Δ RabBD or MyRIP–Ct (Figure 4D and F). Together, these results show that the targeting of MyRIP to the synaptic regions at the tip of the neurites is mediated by its Rab-binding domain. They also show that MyRIP is able to promote the recruitment of myosin VIIa at these emplacements.

DISCUSSION

We have identified a novel Rab effector protein, MyRIP, that binds to myosin VIIa. Several lines of evidence argue in favour of

MyRIP providing a link between the actin cytoskeleton and organelles: (i) MyRIP directly interacts with the actin-based motor protein myosin VIIa and with Rab27A; (ii) MyRIP, Rab27A and myosin VIIa are detected on retinal melanosomes; and (iii) MyRIP is able to interfere with myosin VIIa tail localization and, in particular, to promote its recruitment, via the Rab-binding domain, to the tip of the neurites in differentiated PC12 cells.

Previous studies have implicated Rab27A in the transport of the skin melanosomes (Marks and Seabra, 2001). Mutations of *Rab27a* were found in *ashen* mutant mice, which exhibit clumping of melanosomes in the perinuclear region of skin

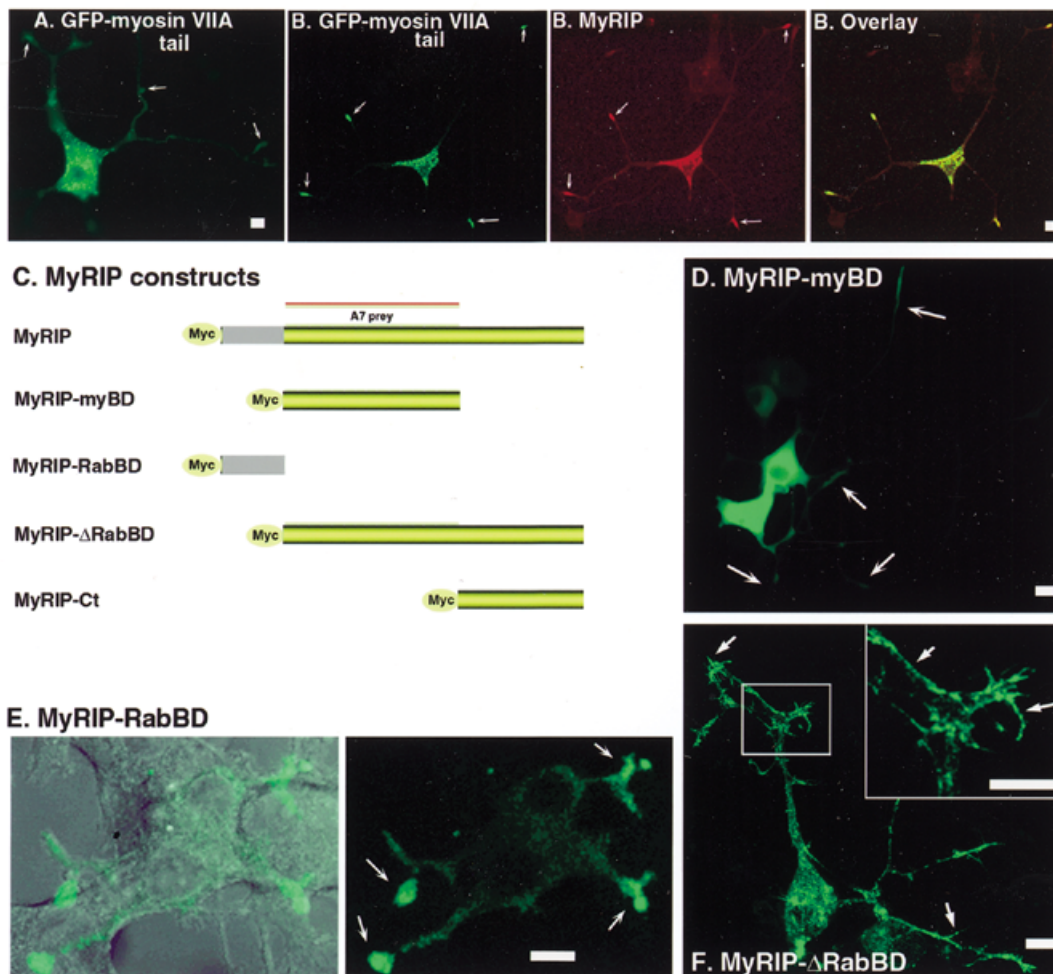


Fig. 4. In PC12 cells producing the GFP–myosin-VIIa tail alone (A), the labelling is observed essentially in the cell body, whereas the neurites are unstained (arrows). In contrast, in PC12 cells coproducing MyRIP and the GFP–myosin-VIIa tail (B), the two proteins are entirely colocalized not only in the cell body, but also at the tip of the neurites (arrows). Different MyRIP truncated forms (C) are produced in PC12 cells. In PC12 cells producing MyRIP–myBD (D), a cytosolic diffuse labelling is observed in the cell body; no labelling is detected at the neurite tips (arrows). In contrast, in cells producing MyRIP–RabBD (E), an enrichment of the immunolabelling is observed at the tip of the neurites (arrows). No such enrichment is observed in PC12 cells producing MyRIP– Δ RabBD (F); immunolabelling is associated with several spines extending from the neurites (arrows). The myc-tagged MyRIP fusion proteins are detected using the anti-myc (9E10) antibody. Scale bar = 10 μ m.

melanocytes (Wilson *et al.*, 2000), and in patients affected by Griscelli syndrome, which associates with partial albinism and immunodeficiency (Menasche *et al.*, 2000). Myosin Va has also been shown to be involved in melanosome trafficking, since *Myo5a* mutations have been identified both in *dilute* mice, which exhibit defects in the trafficking of skin melanosomes (Mercer *et al.*, 1991), and in patients affected by Griscelli syndrome (Pastural *et al.*, 2000). Moreover, several studies on skin melanocytes have led to the conclusion that Rab27A recruits myosin Va onto melanosomes and thereby enables the capture and local actin-based movement of these organelles towards the cell periphery (Bahadoran *et al.*, 2001; Hume *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2001). These studies thus demonstrate that myosin Va and Rab27A are part of a melanosome trafficking machinery. However, it is not yet clear whether these molecules bind directly to each other. Our results show that MyRIP provides a physical link between Rab27A, on the retinal

melanosome membrane, and the actin-based motor molecule myosin VIIa. We propose that myosin VIIa, MyRIP and Rab27A act together to coordinate the short range peripheral movement of melanosomes along the actin-rich microvilli of retinal pigment epithelium cells (Figure 5). As a corollary, the loss of a functional myosin-VIIa–MyRIP–Rab27A complex is likely to account for the perinuclear accumulation of the melanosomes observed in the retinal cells of myosin-VIIa-defective *shaker-1* mice (Liu *et al.*, 1998). However, *shaker-1* mice do not exhibit visual impairment, which indicates that the proper localization of the retinal melanosomes is not required for retinal viability.

During the completion of this study, Matesic *et al.* (2001) reported that *leaden*, another coat pigmentation mouse mutant, results from a defect in *Slac2a*/melanophilin, and Kuroda *et al.* (2002) found that *Slac2a/b* and *Slp1-4* interact with Rab27A. MYRIP and melanophilin show no homology, and melanophilin lacks the region that, in MyRIP, binds to myosin VIIa. However,

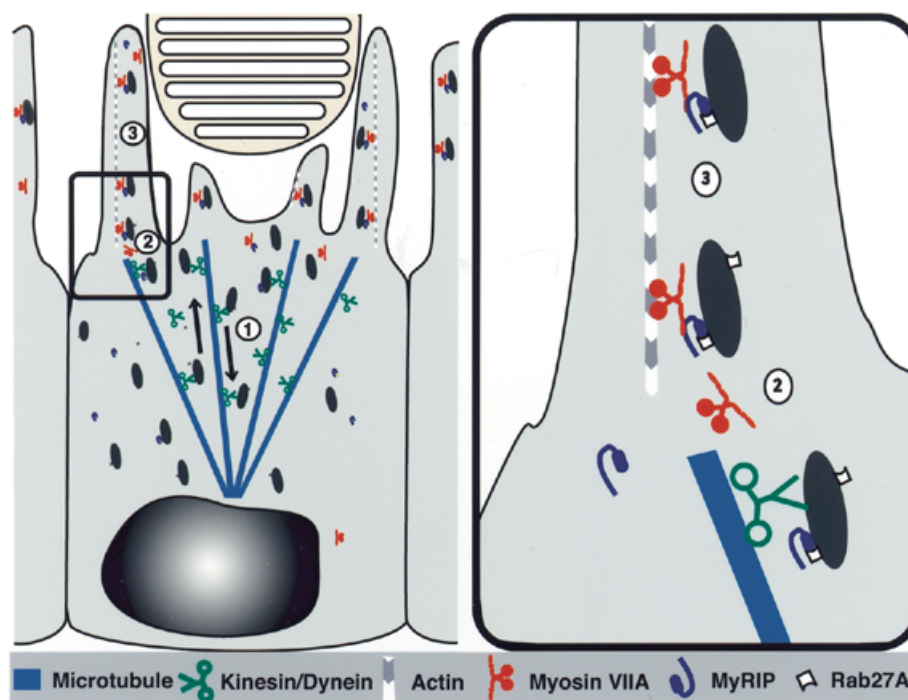


Fig. 5. Model of the trafficking of melanosomes in the retinal pigment epithelium cells. (1) Melanosomes display fast, bidirectional, microtubule-dependent long-range movements in the cell body. (2) Rab27A targeted to the melanosome membrane interacts with its effector, MyRIP, which in turn binds to the actin-based motor protein myosin VIIA. (3) Myosin VIIA then enables the local movement of the melanosomes along the actin filaments of the microvilli.

the two proteins shared similar FYVE domains, both of which contain two Zn^{2+} -binding sites followed by a SLEW(F/Y)Y motif (see Figure 1B). Slac2b and Slp1-4 also possess a similar motif in their SHD2 domain, e.g. SGQWFY in Slp2 protein (Kuroda *et al.*, 2002). We show here that mutating the SLEWFY motif of MyRIP does not impair its binding to Rab27A. The MyRIP–Rab27A interaction thus may involve the N-terminal α -helical segment, upstream of the Zn^{2+} -binding sites, a region that has been shown to mediate Rim–Rab3A binding (Sun *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001). Interestingly, the melanophilin defect in *leaden* mice is due to the deletion of 7 aa (REEERLQ) between aa 31 and 37, i.e. within the corresponding α -helical segment of the protein (Matesic *et al.*, 2001). Similar amino acids are observed in MyRIP (KEEERLS, aa 31–37), Rim (TEEERNI, aa 29–35), Slac2b and Slps, thus suggesting that the Rab-binding sites of all these proteins are located within their N-terminal α -helical domain (or SHD1 domain, according to Kuroda *et al.*, 2002). By analogy with the interactions described here, we consider that the *leaden* phenotype is likely due to a disruption of melanophilin binding to Rab27A. In any case, the finding that *leaden* results from a defective MyRIP-related protein supports our proposal that MyRIP is involved in melanosome trafficking. Therefore, peripheral melanosome trafficking in retinal pigment epithelium cells and in skin melanocytes would depend on the same Rab protein, Rab27A, but would involve two different motor proteins, myosin VIIa and myosin Va, respectively.

The presence of MyRIP in the synaptic areas of inner ear hair cells and retinal photoreceptor cells suggests that this protein is involved in the trafficking of other organelles, including synaptic vesicles. In PC12 cells, MyRIP is able to target the myosin VIIa

tail to the tips of the neurites, where secretory vesicles are concentrated. Preliminary data suggest that MyRIP is associated with secretory vesicles in these cells. Interestingly, when the myosin VIIa tail is coexpressed with MyRIP lacking the Rab-binding domain, MyRIP- Δ RabBD, the two proteins perfectly colocalized in PC12 cells, but no enrichment was observed at the tips of the neurites. Therefore, MyRIP–RabBD likely mediates the targeting of MyRIP–myosin-VIIa complex to the tip of the neurites. Although we still do not know whether Rab27A is present at the tip of these neurites, in the retinal pigment epithelium cells, the localization of the three proteins at the apical cell microvilli strongly suggests that Rab27A recruits the MyRIP–myosin-VIIa complex via an interaction with MyRIP–RabBD. Finally, MyRIP is expressed in wide range of tissues, among which some lack Rab27A and/or myosin VIIa (i.e. muscle, heart and brain). The here-described dynamic module and its likely variant, made up myosin-V–melanophilin–Rab27A, led us to put forward the idea that unconventional myosin/myosin- and Rab-binding protein/Rab form a sort of basic recognition unit. Heterogeneity of this unit may underlie its contribution to different steps of vesicle trafficking. Since we propose Rab27A as a component of two of them, the possibility that also melanophilin and MyRIP belong to different modules is worth considering.

METHODS

MyRIP and other expression constructs. Yeast two-hybrid screening of a human retinal library was performed as described previously (Kussel-Andermann *et al.*, 2000a). The cDNA of clone A7 was used to isolate the MyRIP full-length cDNA from

a retinal cDNA library in λ gt11 (Clontech). The mouse MyRIP cDNA (DDBJ/EMBL/GenBank accession No. AF396688) was obtained by 5' RACE-PCR using an inner ear Marathon cDNA. Oligonucleotides designed from the rat EST226177 clone were used for amplification.

The MyRIP full-length coding sequence (aa 1–859) was PCR-amplified from human retina Marathon cDNA and subcloned in the pCMV-tag3B vector (Clontech). The following myc-tagged MyRIP truncated constructs were generated: pCMV3B-MyRIP-RabBD (aa 1–134); pCMV3B-MyRIP- Δ RabBD (aa 138–859); pCMV3B-MyRIP-myBD (aa 138–568); and pCMV3B-MyRIP-Ct (aa 561–859). The mutant form of the MyRIP-RabBD was generated by PCR amplification. The GFP-myosin-VIIa tail construct has been described previously (Kussel-Andermann *et al.*, 2000b).

Anti-MyRIP antibodies. Three different anti-MyRIP polyclonal antibodies were generated in the rabbit: anti-hA7 was raised against a His₆-tagged A7 fusion protein derived from the human MyRIP sequence (aa 186–383); and anti-mA7 was raised against a His₆-tagged A7 fusion protein derived from the murine MyRIP sequence (aa 110–305); anti-hA7P was raised against a peptide, hA7P: EAPSRQPRDQGQHPRC, derived from the human MyRIP sequence (aa 310–324). The specificity of the three immunopurified antibodies (anti-hA7, anti-hA7P and anti-mA7) was checked by immunoblot and immunofluorescence analyses.

Binding experiments. For immunoprecipitation experiments, the myosin VIIa tail (aa 847–2215) was cloned in the pCDNA3 vector (Invitrogen). For the production of GST-MyRIP fusion proteins, the following constructs were subcloned in the pGEX-4T1 vector (Pharmacia): pGEX-RabBD (aa 1–134) and pGEX-MyRIP- Δ Ct (aa 1–568). For the production of biotinylated MyRIP, a fragment of MyRIP-myBD corresponding to aa 138–403 was subcloned into the pXa3 vector (Promega). The *in vitro* binding and pull-down experiments were performed as described previously (Kussel-Andermann *et al.*, 2000a).

Immunohistochemistry and electron microscopy analysis. PC12 cells and mouse tissues were fixed with 4% paraformaldehyde and processed for indirect immunofluorescence microscopy as described previously (El-Amraoui *et al.*, 1996). Immunoelectron microscopy was performed on LR White embedded ultra-thin sections of mouse retina as described previously (Wolfrum and Schmitt, 2000). The monoclonal mouse anti-Rab27A was obtained from Transduction Laboratories.

Filter binding assay. Purified Rab proteins (40–120 nM) were loaded with [³H]GTP (7.7 Ci/mmol, Amersham) and incubated with 150 pmoles of GST or GST-fusion proteins immobilized on glutathione-Sepharose in 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol and 50 μ M Zn acetate. The mixture (30–50 μ l) was kept on ice for 15 min. The reaction was terminated by the addition of 3 ml washing buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂) and filtration through glass-fibre filters (Whatman GF/C) preincubated in washing buffer supplemented with 0.5% bovine serum albumin. After three washes, the filters were processed for scintillation counting.

Supplementary data. Supplementary data are available at *EMBO reports* Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank J.-P. Hardelin and S. Safieddine for critical reading of the manuscript, J. Levilliers for her continuous help and R. Schäfer for technical assistance. We thank G. Baldini, M. Cormont, J. Salaméro, M. Zerial, B. Goud, H. Shimomura and G. de Saint Basile for their kind gift of vectors encoding Rab3D, Rab4, Rab5, Rab6, Rab11, Rab26 and Rab27A, respectively. This work was supported by grants from EC (QLG2-CT-1999-00988), R. and G. Strittmatter, Retina-France, A. and M. Suchert, Forschung contra Blindheit-Initiative Usher Syndrome, Deutsche Forschungsgemeinschaft (Wo548/3 and /4) and FAUN-Stiftung (to U.W.).

REFERENCES

- Bahadoran, P. *et al.* (2001) Rab27a: a key to melanosome transport in human melanocytes. *J. Cell Biol.*, **152**, 843–849.
- El-Amraoui, A., Sahly, I., Picaud, S., Sahel, J., Abitbol, M. and Petit, C. (1996) Human Usher IB/mouse *shaker-1*: the retinal phenotype discrepancy explained by the presence/absence of myosin VIIa in the photoreceptor cells. *Hum. Mol. Genet.*, **5**, 1171–1178.
- Hasson, T., Heintzelman, M.B., Santos-Sacchi, J., Corey, D.P. and Mooseker, M.S. (1995) Expression in cochlea and retina of myosin VIIa, the gene product defective in Usher syndrome type 1B. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 9815–9819.
- Haynes, L.P., Evans, G.J., Morgan, A. and Burgoyne, R.D. (2001) A direct inhibitory role for the Rab3-specific effector, Noc2, in Ca²⁺-regulated exocytosis in neuroendocrine cells. *J. Biol. Chem.*, **276**, 9726–9732.
- Hume, A.N., Collinson, L.M., Rapak, A., Gomes, A.Q., Hopkins, C.R. and Seabra, M.C. (2001) Rab27a regulates the peripheral distribution of melanosomes in melanocytes. *J. Cell Biol.*, **152**, 795–808.
- Kuroda, T.S., Fukuda, M., Ariga, H., and Mikoshiba, K. (2002) The Slp homology domain of synaptotagmin-like proteins 1–4 and Slac2 functions as a novel Rab27A binding domain. *J. Biol. Chem.*, **277**, 9212–9218.
- Kussel-Andermann, P., El-Amraoui, A., Safieddine, S., Hardelin, J.P., Nouaille, S., Camonis, J. and Petit, C. (2000a) Unconventional myosin VIIa is a novel A-kinase-anchoring protein. *J. Biol. Chem.*, **275**, 29654–29659.
- Kussel-Andermann, P., El-Amraoui, A., Safieddine, S., Nouaille, S., Perfettini, I., Lecuit, M., Cossart, P., Wolfrum, U. and Petit, C. (2000b) Vezatin, a novel transmembrane protein, bridges myosin VIIa to the cadherin-catenins complex. *EMBO J.*, **19**, 6020–6029.
- Liu, X., Ondek, B. and Williams, D.S. (1998) Mutant myosin VIIa causes defective melanosome distribution in the RPE of *shaker-1* mice. *Nature Genet.*, **19**, 117–118.
- Liu, X., Udovichenko, I.P., Brown, S.D., Steel, K.P. and Williams, D.S. (1999) Myosin VIIa participates in opsin transport through the photoreceptor cilium. *J. Neurosci.*, **19**, 6267–6274.
- Marks, M.S. and Seabra, M.C. (2001) The melanosome: membrane dynamics in black and white. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 738–748.
- Matesic, L.E., Yip, R., Reuss, A.E., Swing, D.A., O'Sullivan, T.N., Fletcher, C.F., Copeland, N.G. and Jenkins, N.A. (2001) Mutations in Mlph, encoding a member of the Rab effector family, cause the melanosome transport defects observed in *leaden* mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 10238–10243.
- Menasche, G. *et al.* (2000) Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nature Genet.*, **25**, 173–176.
- Mercer, J.A., Seperack, P.K., Strobel, M.C., Copeland, N.G. and Jenkins, N.A. (1991) Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus. *Nature*, **349**, 709–713.
- Ostermeier, C. and Brünger, 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**, 363–374.
- Pastural, E. *et al.* (2000) Two genes are responsible for Griscelli syndrome at the same 15q21 locus. *Genomics*, **63**, 299–306.

A. El-Amraoui et al.

- Petit, C. (2001) Usher syndrome: from genetics to pathogenesis. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **2**, 271–297.
- Self, T., Mahony, M., Fleming, J., Walsh, J., Brown, S.D. and Steel, K.P. (1998) *Shaker-1* mutations reveal roles for myosin VIIa in both development and function of cochlear hair cells. *Development*, **125**, 557–566.
- Sun, L., Bittner, M.A., Holz, R.W. and Araki, K. (2001) Rab3a binding and secretion-enhancing domains in Rim1 are separate and unique. Studies in adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.*, **276**, 12911–12917.
- Wang, X., Hu, B., Zimmermann, B. and Kilimann, M.W. (2001) Rim1 and Rabphilin-3 bind Rab3-GTP by composite determinants partially related through N-terminal α -helix motifs. *J. Biol. Chem.*, **276**, 32480–32488.
- Wilson, S.M. et al. (2000) A mutation in Rab27a causes the vesicle transport defects observed in *ashen* mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 7933–7938.
- Wolfrum, U. and Schmitt, A. (2000) Rhodopsin transport in the membrane of the connecting cilium of mammalian photoreceptor cells. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **46**, 95–107.
- Wu, X., Rao, K., Bowers, M.B., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Hammer, J.A. (2001) Rab27a enables myosin Va-dependent melanosome capture by recruiting the myosin to the organelle. *J. Cell Sci.*, **114**, 1091–1100.

DOI: 10.1093/embo-reports/kvf090

III.E.1.b. Résultats

Dans cet article, nous présentons la découverte de MyRIP, une nouvelle protéine de 859 acides aminés liant la myosine-7a. Dans sa partie amino-terminale, cette protéine comporte un domaine (aminoacides 1 à 134) similaire à ceux retrouvés dans RIM, Noc2 et la Rabphiline, trois effecteurs de Rab3. Les 8 cystéines du domaine FYVE sont conservées, et le motif SGAWF(F/Y), trouvés dans les effecteurs de Rab3 et important pour leur liaison à Rab3, est retrouvé sous une forme proche (SLEWFY, voir Figure 1 de l'article). La région N-terminale comprend aussi une région d'homologie avec le domaine hélical de la Rabphiline et de RIM qui constitue le domaine minimal de liaison à Rab3 (Sun *et al.*, 2001). La partie 134-561 comporte le domaine de liaison à la myosine-7a.

Sur la base de ces similarités, une interaction de MyRIP avec les isoformes de Rab3 a été recherchée. Aucune de ces isoformes (Rab3a,b,c et d) n'interagit avec MyRIP, pas plus que les Rab4, 5, 6, 11 et 26. En revanche, une interaction de MyRIP avec la forme liée au GTP de Rab27a est trouvée. De manière surprenante, alors que la mutation du motif SGAWFY de Noc2 en SGAAAA inhibe son interaction avec Rab3 (Haynes *et al.*, 2001), la mutation du motif SLEWFY de MyRIP en SLEAAA n'abolit pas sa liaison avec Rab27a:GTP.

La localisation de MyRIP, Rab27a et de la myosine-7a a été étudiée dans la rétine et les cellules en brosse de l'oreille interne, i.e. où se manifestent les défauts liés aux mutations de la myosine-7a chez les patients atteints par USH1B et les souris *shaker-1*. Dans l'oreille interne, MyRIP est trouvée dans les cellules en brosse de la cochlée et du vestibule, où elle est colocalisée avec la myosine-7a, en particulier dans les régions synaptiques de ces cellules.

Dans la rétine, les trois protéines se localisent à la surface des mélanosomes contenus dans les microvillosités des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien. MyRIP est également trouvée dans la région synaptique (pré- et post-synaptique) des cellules photoréceptrices de la rétine, d'où Rab27a semble absente.

La présence de MyRIP dans les régions synaptiques de ces neurones (rétine et oreille interne) nous a conduits à examiner le rôle de MyRIP pour le recrutement de la myosine-7a dans le contexte de la lignée neuroendocrine PC12.

Dans ces cellules, la protéine MyRIP surexprimée a une distribution ponctuée et est colocalisée avec la chromogranine A, suggérant une association aux vésicules de sécrétion. De plus, la surexpression de MyRIP favorise la localisation de la myosine-7a à l'extrémité des neurites (où s'accumulent les vésicules de sécrétion). Cette localisation de la myosine-7a dans les neurites dépend de la présence du domaine de liaison à Rab27 (RBD, Rab Binding Domain) de MyRIP, dans la mesure où l'enrichissement "neuritique" de la myosine-7a n'est pas observé après co-expression d'une forme tronquée de MyRIP sans RBD (MyRIP- Δ RBD). La colocalisation de MyRIP- Δ RBD et de la myosine-7a est conservée (voir Figure 56 issue des données supplémentaires en ligne). Cependant, la distribution de MyRIP- Δ RBD est très différente de celle de la forme sauvage et suggère une association avec le cytosquelette d'actine en périphérie de la cellule.

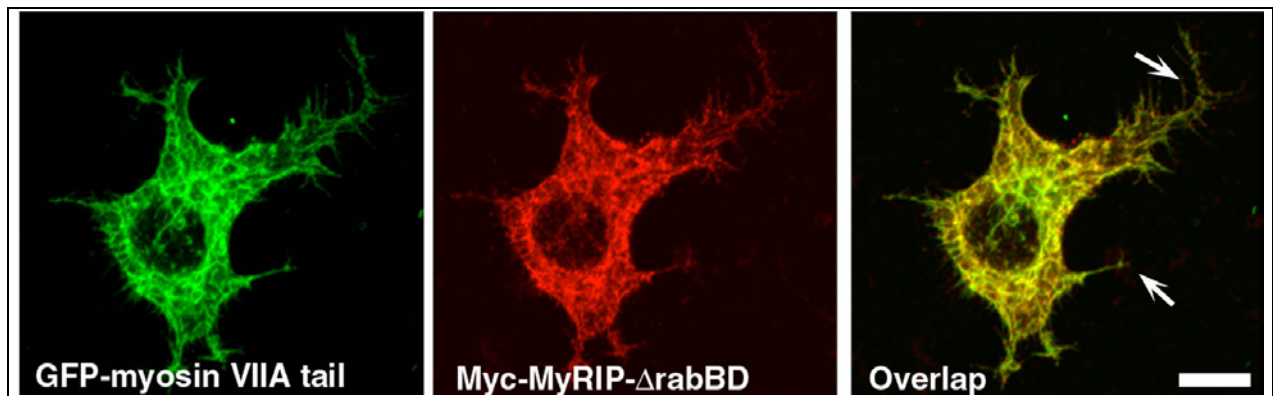


Figure 56

Etude en microscopie confocale de la colocalisation de la queue de la myosine-7a (fusionnée à la GFP) avec un mutant de MyRIP tronqué de son domaine de liaison à Rab27a (MyRIP- Δ rabBD), dans des cellules PC12 différenciées au NGF. Les deux protéines colocalisent largement, mais aucun enrichissement notable des protéines n'est observé dans les extensions pseudo-neuritiques (flèches). Illustration issue de El-Amraoui *et al.*, 2002, données supplémentaires disponibles en ligne.

III.E.1.c. Discussion

MyRIP lie à la fois la myosine-7a et Rab27a:GTP. Les données présentées dans l'article suggèrent que MyRIP permette d'établir un lien physique entre Rab27a et la myosine-7a. On notera en particulier que la distribution ponctuée de MyRIP dans les cellules PC12 et son accumulation à l'extrémité des neurites (où elle peut entraîner la myosine-7a) suggèrent fortement une association aux granules de sécrétion ; cette localisation dépend du domaine RBD. Peu de temps après la publication de cet article, nous avons montré l'association des ces 3 protéines au sein d'un complexe ternaire, constitué de MyRIP, Rab27a et myosine-7a. Nous

avons donc proposé que MyRIP constitue le "chaînon" manquant entre Rab27a et la myosine-7a, et que ce complexe tripartite joue un rôle dans la mobilité des mélanosomes dans les cellules pigmentaires de l'épithélium rétinien, en liant physiquement ces organelles au cytosquelette (voir Figure 57).

Ces résultats ont permis d'expliquer certains aspects du syndrome de Usher-1B (défaut de localisation des mélanosomes rétiens). Surtout, ils contribuent à l'élucidation de la fonction de Rab27 et, plus généralement, des GTPases Rab. Rab27 agirait en recrutant, sur une vésicule de transport (ici, les mélanosomes), des moteurs moléculaires (ici, une myosine). Rab27 peut ainsi contrôler l'association des mélanosomes au cytosquelette d'actine et favoriser leur mouvement au sein du réseau de microfilaments. Cela n'est pas sans rappeler les travaux sur Rab6, qui recrute une protéine de la famille des kinésines, la Rabkinésine-6 (Echard *et al.*, 1998). De même, les protéines de la famille Rab11 recrutent la myosine-5b, directement (Lapierre *et al.*, 2001) ou par le biais de la protéine Rab11-FIP2 (Rab11 family interacting protein 2 ; Hales *et al.*, 2002), qui ne lie pas les Rab3, 4, 5, 6 et 7 (Lindsay *et al.*, 2002).

Au moment où nous avons publié cet article, Matesic et coll. décrivaient l'interaction de la mélanophiline avec Rab27 (Matesic *et al.*, 2001). La mélanophiline, également capable de lier la myosine-5a (Fukuda *et al.*, 2002c; Nagashima *et al.*, 2002; Strom *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2002), fournit le lien entre Rab27a et la myosine-5a. Le complexe Rab27/mélanophiline/myosine-5a contrôle le trafic des mélanosomes dans les mélanocytes (voir plus loin). De façon intéressante, la mélanophiline et MyRIP, bien que non directement reliées, partagent tout de même certains déterminants proches. De façon plus générale, la mélanophiline appartient à une famille de protéines, les Slp/Slac2, qui paraissent importantes pour le lien entre vésicules et cytosquelette (voir l'introduction de l'article soumis à *J. Cell Biol.* pour une discussion sur cette famille de protéines).

Nous avons vu que MyRIP est présente dans les régions synaptiques des neurones de la rétine; de plus, des données non publiées de microscopie électronique montrent une association de MyRIP aux rubans synaptiques de la rétine. Malgré l'absence de Rab27a dans les cellules photoréceptrices, cette Rab pourrait avoir un rôle potentiel dans le trafic de VS, ce qui est en accord avec l'association supposée aux GS dans les cellules PC12. L'implication de

plusieurs Rab, dont Rab27, dans la liaison de vésicules au cytosquelette, et la proximité génétique entre Rab27 et Rab3 nous ont incités à étudier l'implication éventuelle des ces protéines dans la régulation de l'exocytose régulée. Les résultats de cette étude ont été soumis à *The Journal of Cell Biology*, et sont en cours de révision, au moment de l'écriture de ce manuscrit. Dans la partie qui suit, j'exposerai brièvement ce que nous savons de Rab27 et de ses rôles physiologiques en préambule au manuscrit soumis.

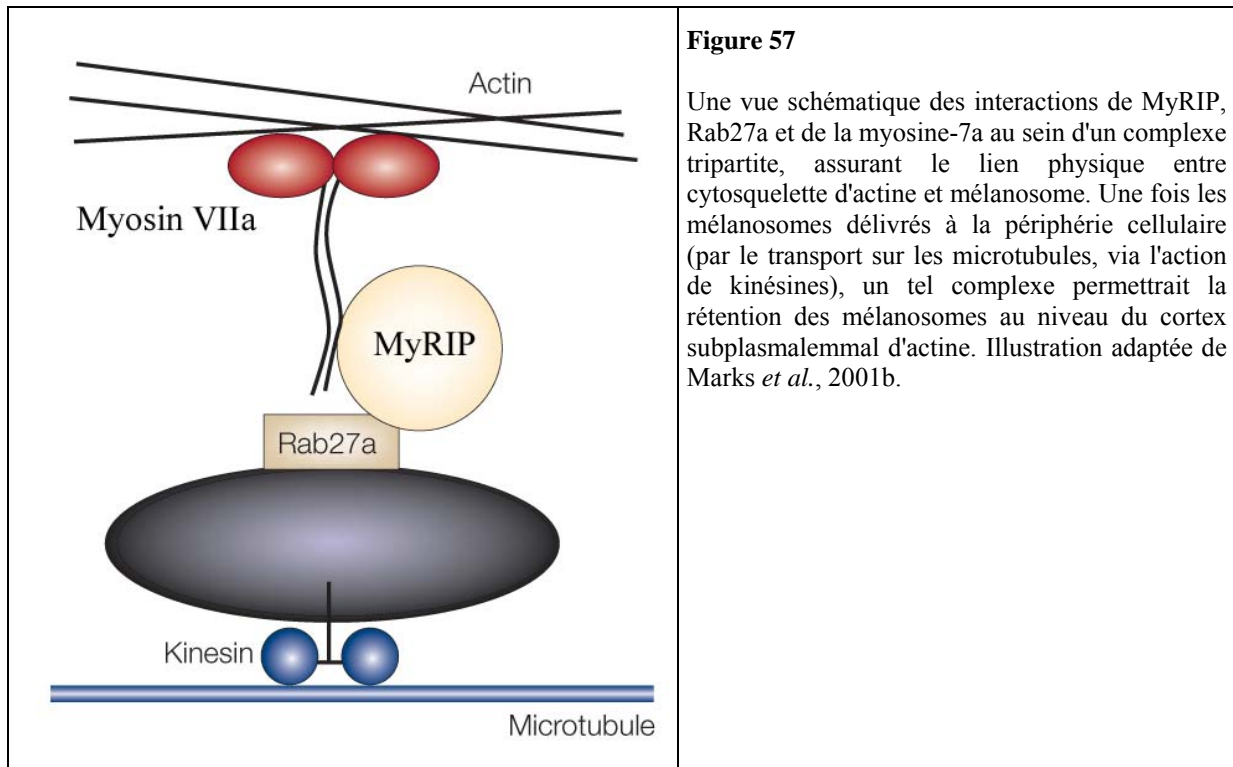


Figure 57

Une vue schématique des interactions de MyRIP, Rab27a et de la myosine-7a au sein d'un complexe tripartite, assurant le lien physique entre cytosquelette d'actine et mélanosome. Une fois les mélanosomes délivrés à la périphérie cellulaire (par le transport sur les microtubules, via l'action de kinésines), un tel complexe permettrait la rétention des mélanosomes au niveau du cortex subplasmalemmal d'actine. Illustration adaptée de Marks *et al.*, 2001b.

III.E.2. Rôles de MyRIP et Rab27a dans la sécrétion régulée

III.E.2.a. Introduction

L'observation initiale de l'analogie entre les domaines RBD de MyRIP et de Rabphilin, RIM et Noc2 suggérait une association de MyRIP aux Rab3 ; de plus, Rab3 avait été localisé sur les mélanosomes de cellules B16, dérivant d'un mélanome murin (Araki *et al.*, 2000), et voir également (Scott *et al.*, 2001). Ce sont les études récentes de l'implication de Rab27 dans le transport des mélanosomes, à la fois dans des modèles animaux et dans des pathologies humaines, qui nous ont amenés à considérer Rab27a comme un candidat à l'interaction avec MyRIP.

III.E.2.a.i. Implication de Rab27 dans la choroïdérémie

En fait, un rôle de Rab27 dans le trafic des mélanosomes de l'épithélium pigmentaire rétinien avait été suggéré depuis 1997 dans la choroïdérémie (CHM), une dégénérescence rétinienne d'origine génétique avec une prévalence de $\sim 1/100.000$ naissances (Seabra *et al.*, 1995). L'origine génétique de la CHM est en fait une mutation de REP1, la Rab Escort Protein 1, dont le rôle pour la prise en charge des Rab et leur présentation à la géranylgeranyl transférase (GGTase) a déjà été évoqué. Bien que les cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine contiennent sans doute des dizaines de Rab, c'est manifestement le défaut de prénylation de Rab27 qui est à l'origine de cette rétinopathie dégénérative. La présence d'une autre REP (REP2) semble ne pas pouvoir corriger ce défaut pour la prénylation de Rab27. Ceci semble tenir à l'apparente faible affinité de Rab27 pour le complexe REP2/GGTase II comparée à celle pour REP1/GGTase II. De façon étonnante, les autres Rab testées dans cette étude (Rab1a, Rab3a/b/d, Rab5a et Rab6) ne semblent pas discriminer entre les 2 REP. De façon intéressante, Seabra et coll. avaient déjà localisé Rab27 dans l'épithélium pigmentaire rétinien, mais pas dans les cellules photoréceptrices (Seabra *et al.*, 1995).

III.E.2.a.ii. Rab27 et syndrome de Griscelli

Le lien entre Rab27 (initialement cloné sous le nom de Ram, par le groupe de Nozawa (Nagata *et al.*, 1989; Nagata *et al.*, 1990), et rebaptisé Rab27 sur la proposition de Miguel Seabra (Seabra *et al.*, 1995) et le trafic des mélanosomes est devenu plus clair avec son implication dans le syndrome ou maladie de Griscelli (Menasche *et al.*, 2000), qui réunit albinisme partiel, immunodéficience et/ou troubles neurologiques. De même que les symptômes du syndrome de Usher peuvent résulter de l'altération de plusieurs gènes, le syndrome de Griscelli recouvre diverses formes liées à des mutations de gènes distincts (Menasche *et al.*, 2000; Pastural *et al.*, 2000).

III.E.2.a.ii.a. Syndromes de Griscelli et de Elejalde

Comme dans le cas du syndrome de Usher, la mutation d'une myosine (myosine-5a dans le cas de Griscelli) est responsable d'une des deux formes de la maladie (Pastural *et al.*, 1997). Cette forme du syndrome de Griscelli (GS type 1) serait en fait le syndrome décrit par Elejalde (Elejalde Syndrome -ES-, ou syndrome neuroectodermique mélanolysosomal). Cette forme présente un albinisme partiel, un large spectre de troubles ophtalmologiques, des

lésions neurologiques congénitales ou bien se développant durant l'enfance, mais aucun défaut immunologique. Les souris de la lignée *dilute*, déficientes en myosine-5a (Mercer *et al.*, 1991), possèdent les mêmes symptômes que les patients atteints du syndrome de Griscelli de type 1.

Le GS de type 1 fut la première forme du syndrome à être caractérisée sur le plan moléculaire. L'hétérogénéité des symptômes du syndrome a poussé les recherches vers l'identification d'autres gènes responsables. La seconde forme du syndrome de Griscelli (GS type 2) est due à des mutations de la protéine Rab27a, et a pu également être identifiée comme identique au syndrome PAID (Partial Albinism with ImmunoDeficiency), combinant albinisme partiel, désordres hématologiques et immunologiques (Menasche *et al.*, 2000). Ceux-ci comprennent anémie, absence d'activité des lymphocytes T cytotoxiques et cellules NK (*natural killer*), amenant un syndrome dit hémophagocytaire. Chez les patients atteints de cette forme de la maladie, on n'observe pas de troubles neurologiques primaires. Cependant, lors d'épisodes aigus de la maladie, une prolifération de lymphocytes suivie de leur infiltration pathologique dans de nombreux tissus, dont le SNC, peuvent occasionner des troubles neurologiques secondaires, comparables à ceux du syndrome de Chediak-Higashi. La précocité d'apparition de tels troubles neurologiques consécutifs au dysfonctionnement immunitaire explique la confusion qui a pu régner entre les deux formes de la maladie, entretenue il est vrai par la proximité, sur la carte physique, des deux marqueurs génétiques (situés à ~1,6 cM sur le chromosome 15q21).

Chez la souris, la lignée *ashen* présente les caractéristiques du syndrome de Griscelli dit de type 2. Wilson et coll. ont démontré que ces souris sont mutées dans le gène codant Rab27a (Wilson *et al.*, 2000).

Du fait de l'origine génétique distincte des deux formes du GS (mutation de MYO5A et RAB27A), le groupe de Haggit Hurvitz propose d'abandonner l'appellation GS type 1 pour les patients présentant des mutations de la Myosine 5a au profit de celle de Syndrome de Elejalde (Anikster *et al.*, 2002).

III.E.2.a.iii. Le mélanosome et autres organelles apparentées au lysosomes

Le symptôme commun aux deux formes de la maladie est un albinisme partiel. L'accumulation inégale de grains de mélanine de grande taille est observée dans les cheveux des patients, contrairement aux cheveux normaux, où les grains de mélanine de petite taille sont régulièrement répartis. Au niveau de la peau, cet albinisme est caractérisé par le défaut du transfert de la mélanine, incluse dans les mélanosomes, depuis les mélanocytes vers les kératinocytes. Les mélanosomes partagent un certain nombre de points communs avec les compartiments endosomaux (voir Figure 58), de même que les granules lytiques des lymphocytes T ou des cellules NK, dont le défaut d'exocytose est à la base du syndrome hémophagocytaire dans la maladie de Griscelli de type 2 (=PAID).

Les modalités moléculaires du transfert de la mélanine depuis les mélanocytes vers les kératinocytes restent encore obscures, et pourraient faire intervenir la phagocytose par le kératinocyte du dendrite mélanocytaire et/ou l'exocytose du mélanosome suivie de son endocytose par le kératinocyte (Yamamoto *et al.*, 1994).

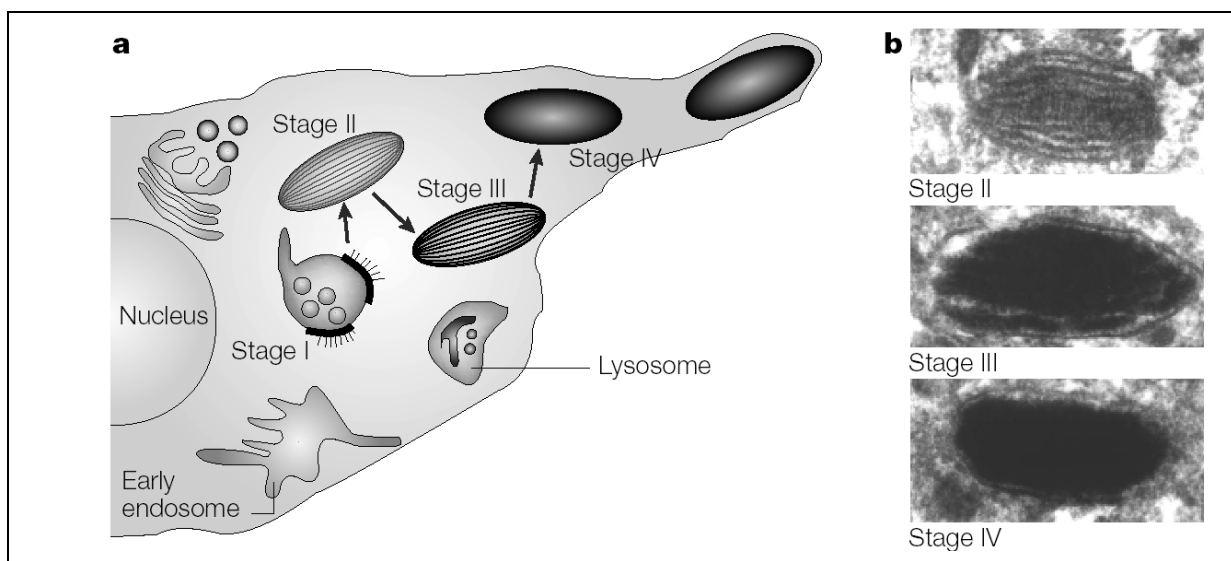


Figure 58

Etape de la production et de la maturation des mélanosomes. L'origine des pré-mélanosomes (stage I, ne contenant pas de pigment) semble être les endosomes précoces, même si ce point reste débattu. Ils contiendraient de nombreuses membranes internes ("multivesicular bodies") typique de structures endosomales tardives. Ces structures subissent une maturation fonctionnelle, aboutissant à la formation du pigment dans les mélanosomes matures (stage IV). Le mélanosome mature serait ensuite transporté à la périphérie du mélanocyte, où son contenu serait transféré au kératinocyte par un mécanisme encore discuté (phagocytose et/ou exocytose-endocytose). Illustration issue de Marks *et al.*, 2001b.

III.E.2.a.iv. *Leaden, dilute et ashen*

Une cinquantaine de loci ont été impliqués dans la pigmentation du pelage chez la souris. Parmi ceux-ci, les mutations *leaden*, *dilute* et *ashen* ont été regroupées fonctionnellement, du fait que les mélanosomes sont présents chez ces animaux, mais leur transport y est déficient. Les lignées *dilute* et *ashen*, respectivement déficientes pour la myosine-5a et Rab27a, ont déjà été présentées.

Vers la fin de notre étude consacrée à l'identification de MyRIP, Matesic et coll. ont identifié des mutations de la mélanophiline, produit du gène *MLPH*, comme responsables des défauts trouvés dans les souris de la lignée *leaden* (Matesic *et al.*, 2001). La mélanophiline ne possède pas de similarité globale avec MyRIP, mais son fragment amino-terminal possède néanmoins une certaine identité avec celui de la Rabphiline, la famille Slp/Slac2 (voir plus loin) et MyRIP. Le motif SLEWIFY de MyRIP est trouvé, quasiment à l'identique, dans la mélanophiline. De façon intéressante, le motif tronqué dans la mélanophiline chez les souris *leaden* est également retrouvé dans MyRIP, sous une forme proche (KEEERLS). Ces motifs sont localisés dans le domaine α -hélicale de la partie N-terminale des ces protéines, qui interagit avec les Rab. Cette délétion entraîne probablement l'altération de la liaison de la mélanophiline à Rab27, et l'impossibilité de constituer un complexe Rab27a/Mélanophiline/myosine-5a, conduisant au défaut de la localisation des mélanosomes chez les souris *leaden*.

<i>Melanophilin</i>	MGKRLD - - - LSTLTDEEAHVWAVVQDFDLRR	REEERL	36
<i>granophilin</i>	MSEILD - - - LSFLEMERDLILGVLQRDEELRK	ADEKRI	36
<i>Slp3-a</i>	MAHEVD - - - LESFKELERDIILRVLYRDQTVQ	STEEERV	36
<i>Rabphilin 3A</i>	PGAQTDQRKQEELTDEEKEIINRVIA	RAEKMEEA	72
<i>Melanophilin</i>	QGLKGIQKESKRELLSDTAHLNETH	CARQLQPYRLLN	76
<i>granophilin</i>	RRLKNELLEIK-RKGAKRGSQHYS	DRTCARQEGLGRLIP	75
<i>Slp3-a</i>	RKLKSHLQHLR-WKGAKSSSQEYKEK	CARQQRALGLLN	75
<i>Rabphilin 3A</i>	QRLVDRLETMR--KNVAGDG - - - VNR	ILQGEQLGMLGS	106
<i>Melanophilin</i>	SRRQLECSLFCVCKSSHAHPPEEQ - - -	GWLDPCHLARVV	113
<i>granophilin</i>	KSSTVGCNHLVCRESRVLESNG - - -	SWRQKVSKEIEL	111
<i>Slp3-a</i>	RGAVQGSRRVSESRVFLRRTR - - -	ANKQTVCFEDRNV	112
<i>Rabphilin 3A</i>	ACVVEDCKKNVCTKQGVETSNNR	PHVMLQKILEQREY	146
<i>Melanophilin</i>	KIGSLEWYQHVRR	RF	129
<i>granophilin</i>	KKATGDWFDQKVN	RF	127
<i>Slp3-a</i>	KIKTGEWFFEEER	AKF	128
<i>Rabphilin 3A</i>	WKRSGAWFFKGF	PKQV	162

Figure 59

Comparaison des parties amino-terminales de la mélanophiline, le produit du gène *MLPH*, affecté chez les souris de la lignée *leaden*, avec les parties correspondantes de la Rabphiline et d'autres protéines contenant un domaine FYVE similaire. La mélanophiline, comme MyRIP, comporte un domaine du type SGAWFF (ici SLEWIFY, en jaune). Un motif (REEERLQ, en bleu) est affecté chez les souris *leaden*, et un motif proche est trouvé dans MyRIP (KEEERLS). Issu de Matesic *et al.*, 2001.

Ainsi, d'autres protéines, fonctionnellement similaires à MyRIP sont également impliqués dans le trafic d'organites (ici, des mélanosomes) et à des défauts pathologiques de leur localisation intracellulaire.

III.E.2.a.v. Les familles Slp/Slac2

Les domaines C2, déjà présentés pour les synaptotagmines et la Rabphiline-3a, sont des motifs couramment répandus, et présents dans des protéines aussi variées que des GAP, des kinases, des enzymes d'ubiquitination et des protéines impliquées dans le trafic vésiculaire. Le nombre de domaine C2 dans une protéine peut varier de un à cinq, et on peut distinguer, au sein des protéines à domaines C2, plusieurs catégories sur des bases structurales et fonctionnelles. Les protéines à domaines C2 impliquées dans le trafic vésiculaire au sens large, comme la Rabphiline-3a, RIM ou les synaptotagmines, possèdent deux domaines C2 en tandem dans leurs parties C-terminales.

Plusieurs de ces protéines ont été regroupés sous le terme de Slp, ou "Synaptotagmin like proteins". Les protéines de cette famille contiennent des domaines C2 homologues à ceux des synaptotagmines, mais contiennent surtout un domaine amino-terminal commun, nommé SHD (Slp Homology domain), qui n'est pas retrouvé dans des protéines proches, comme la Rabphiline-3a (Fukuda *et al.*, 2001). Les protéines de cette famille sont Slp1/Jfc1, Slp2-a-d, Slp3-a/b, Slp4-a (granophiline a) et Slp5 (Wang *et al.*, 1999).

Le domaine SHD peut en fait être séparé en deux sous-domaines, SHD1 et SHD2, qui sont séparés dans Slp3-a et Slp4-a/granophiline par un domaine en doigt à zinc (voir Figure 60). Une autre famille, les Slac2 (Synaptotagmin like proteins lacking C2 domains), possèdent quant à elle les domaines SHD, mais pas de domaines C2. La mélanophiline (Slac2-a) et MyRIP (également désigné Slac2-c par le groupe de Mikoshiba) font partie de cette famille.

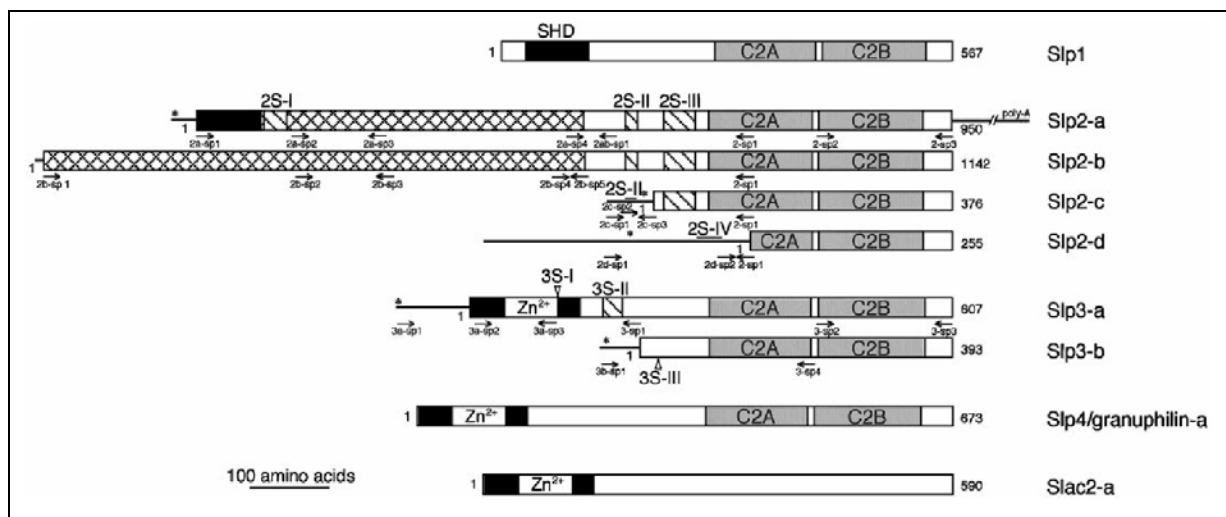


Figure 60
 La famille des protéines Slp. Ces protéines comportent un tandem de domaine C2 homologues à ceux des protéines de la famille des synaptotagmines. Dans Slp3-a, Slp4 et Slac2-a, les deux parties du domaine SHD (1-2, en noir) sont séparées par un motif en doigts à zinc. Illustration tirée de Fukuda *et al.*, 2001.

Le domaine SLEWFY trouvé dans MyRIP appartient au domaine SHD2 de la famille Slp/Slac2. Les travaux récents du groupe de Mikoshiba ont montré que ce domaine était critique pour l'interaction de Slp/Slac2 à Rab27, même si nos propres résultats montrent que la mutation du domaine SLEWFY en SLEAAA n'altère pas la liaison de MyRIP à Rab27a.

Les résultats obtenus sur la localisation d'une forme recombinante de MyRIP dans les cellules PC12 suggéraient que Rab27a puisse être exprimée dans ces cellules et associée aux GS. Nous avons donc testé cette hypothèse, confirmé l'expression de Rab27a et de MyRIP dans les cellules chromaffines et PC12 et étudié le rôle éventuel de Rab27a et de MyRIP dans les mécanismes de transport des GS dans les cellules neuroendocrines. Les résultats issus de l'étude menée dans les cellules PC12 et chromaffines sont présentés dans le manuscrit suivant, soumis à *The Journal of Cell Biology*.

Rab27A and its effector MyRIP link secretory granules to F-actin and control their motion towards release sites

Claire Desnos,¹ Jean-Sébastien Schonn,¹ Sébastien Huet,¹ Viet Samuel Tran,¹ Aziz El-Amraoui,² Graça Raposo,³ Isabelle Fanget,¹ Catherine Chapuis,¹ Gaël Ménasché,⁴ Geneviève de Saint Basile,⁴ Christine Petit,² Sophie Cribier,⁵ Jean-Pierre Henry,¹ and François Darchen¹

¹Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UPR 1929, Institut de Biologie Physico-Chimique, 75005 Paris, France

²CNRS URA 1968, Institut Pasteur, 75724 Paris cedex 15, France

³UMR 144 Curie/CNRS, Institut Curie, 75248 Paris cedex 05, France

⁴Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U429, Hôpital Necker, 75743 Paris cedex 15, France

⁵CNRS UMR 7099, Institut de Biologie Physico-Chimique, 75005 Paris, France

The GTPase Rab27A interacts with myosin-VIIa and myosin-Va via MyRIP or melanophilin and mediates melanosome binding to actin. Here we show that Rab27A and MyRIP are associated with secretory granules (SGs) in adrenal chromaffin cells and PC12 cells. Overexpression of Rab27A, GTPase-deficient Rab27A-Q78L, or MyRIP reduced secretory responses of PC12 cells. Amperometric recordings of single adrenal chromaffin cells revealed that Rab27A-Q78L and MyRIP reduced the sustained component of release. Moreover, these effects on secretion were partly

suppressed by the actin-depolymerizing drug latrunculin but strengthened by jasplakinolide, which stabilizes the actin cortex. Finally, MyRIP and Rab27A-Q78L restricted the motion of SGs in the subplasmalemmal region of PC12 cells, as measured by evanescent-wave fluorescence microscopy. In contrast, the Rab27A-binding domain of MyRIP and a MyRIP construct that interacts with myosin-Va but not with actin increased the mobility of SGs. We propose that Rab27A and MyRIP link SGs to F-actin and control their motion toward release sites through the actin cortex.

Introduction

Hormones and neuropeptides are stored in secretory granules (SGs) and released by exocytosis in response to cytosolic calcium elevation. SGs are formed at the TGN as short-lived vesicular intermediates, termed immature SGs, and transported along microtubules to the cell periphery. Immature SGs are then restricted to the cell periphery within the actin cortex, a dense network of actin filaments, where they mature completely (Rudolf et al., 2001). Thus, outward microtubule-dependent transport and F-actin-dependent capture mediate the cortical localization of SGs. However, if the actin cortex may favor peripheral localization of SGs, it may also hinder the access of vesicles to the plasma membrane. Indeed, the actin network has a mesh smaller than a granule diameter (Nakata and Hirokawa, 1992), and it would completely prevent exocytosis to occur if it were not dynamically remodeled or

severed, in particular upon calcium influx. In adrenal chromaffin cells, exocytosis occurs preferentially at sites where the actin cortex has gaps, suggesting that cortical F-actin acts as a barrier that hampers fusion (Trifaro et al., 2000). Finally, actin filaments or actin bundles can also provide tracks on which SGs move in an energy-dependent manner (Lang et al., 2000; Oheim and Stuhmer, 2000). Whether F-actin promotes or restricts the mobility of SGs and their access to the plasma membrane will finally depend on the dynamics of microfilaments and on the physical interaction of SGs with F-actin.

A similar actin-dependent capture of the pigment-producing organelles, termed melanosomes, has been described in skin melanocytes (Wu et al., 1998), and a detailed molecular mechanism has been recently provided. The GTP-binding protein Rab27A, which is associated with the membrane of melanosomes, recruits melanophilin, the product of *MLPH*, which in turn recruits myosin-VA (Fukuda et al., 2002b;

C. Desnos and J.-S. Schonn contributed equally to this work.

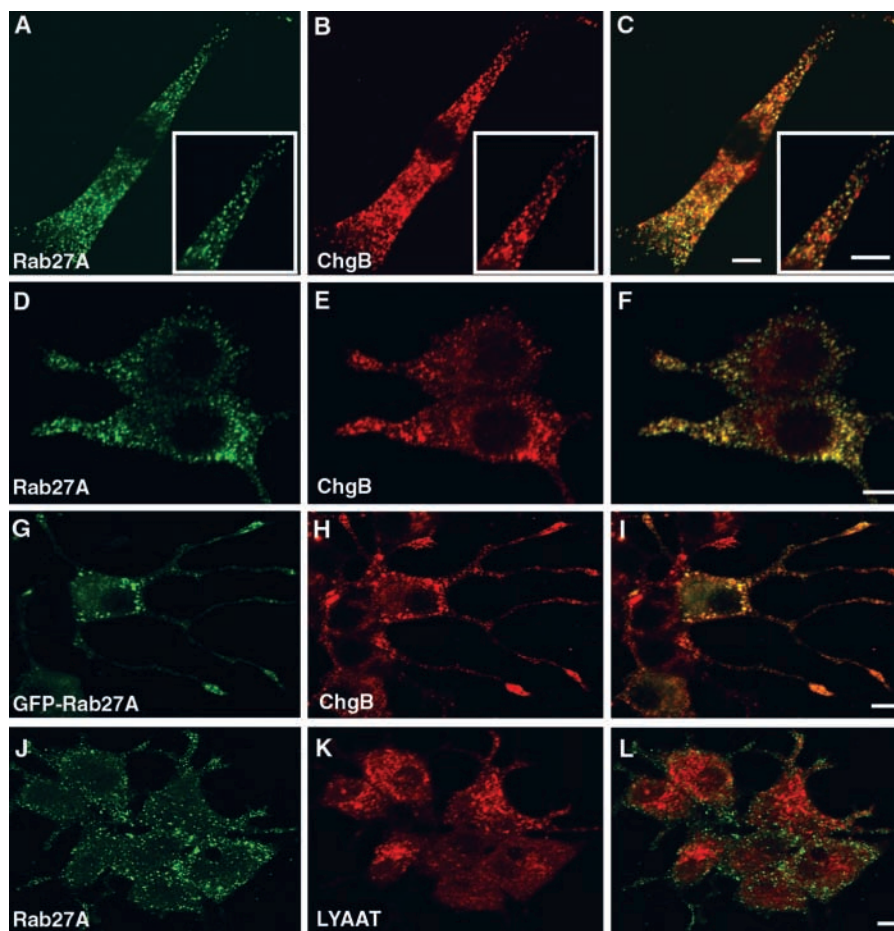
The online version of this article includes supplemental material.

Address correspondence to François Darchen, Institut de Biologie Physico-Chimique, CNRS UPR 1929, 13 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France. Tel.: 33-1-58-41-50-85. Fax: 33-1-58-41-50-23. email: Francois.Darchen@ibpc.fr

Key words: Rab27A; MyRIP; exocytosis; actin; neuroendocrine cell

Abbreviations used in this paper: 5-HT, 5-hydroxytryptamine; CTL, cytotoxic T lymphocyte; EW-FM, evanescent wave fluorescence microscopy; hGH, human growth hormone; MSD, mean square displacement; NPY, neuropeptide Y; SERT, serotonin transporter; SG, secretory granule.

Figure 1. Localization of Rab27A on SGs by confocal immunofluorescence. Chromaffin cells (A–C) were double imaged for endogenous Rab27A (A) and chromogranin A/B (B). Discrete punctate structures were observed in A and B; most of them precisely coincided. See the overlaid image (C) and the detail shown at higher magnification (inset). Anti-Rab27A (D) and anti-chromogranin A/B (E) also stained discrete structures that coincided (F, overlay) in PC12 cells. GFP-Rab27A (G) transiently expressed in NGF-treated PC12 cells also colocalized with chromogranin B–positive structures (H) (I, overlaid image). Note the enrichment of Rab27A and chromogranin B at the tip of neurites. In contrast, Rab27A (J) did not colocalize with LYAAT, a lysosomal marker (K and L). Bars, 5 μ m.



Hume et al., 2002; Strom et al., 2002; Wu et al., 2002). In humans, mutations in *RAB27A* cause Griscelli syndrome, an autosomal recessive disorder characterized by partial albinism and uncontrolled T lymphocyte and macrophage activation (hemophagocytic syndrome) (Ménasché et al., 2000). In melanocytes isolated from these patients or from *ashen* mice bearing loss-of-function mutations in Rab27A, melanosomes are concentrated in the perinuclear region and cannot accumulate at the distal ends of the dendritic extensions (Wilson et al., 2000; Bahadoran et al., 2001; Hume et al., 2001; Wu et al., 2001). Consequently, melanin cannot be transferred to keratinocytes. Similar impairment of melanosome transport is observed in *leaden* and *dilute* mice bearing mutations in *MLPH* (Matesic et al., 2001) and in *MYO5a* (Strobel et al., 1990; Provance et al., 1996), respectively. These observations indicate that Rab27A, melanophilin, and myosin-VA mediate the physical link between melanosomes and F-actin.

In retinal pigment epithelial cells, another melanosome-associated complex made of Rab27A, MyRIP, and myosin-VIIA was described recently (El-Amraoui et al., 2002). MyRIP was found to have a broad tissular distribution (Fukuda and Kuroda, 2002), suggesting that its function may not be restricted to melanosome trafficking. In particular, MyRIP is expressed in the retinal synaptic region and, upon expression in pheochromocytoma PC12 cells, was targeted to the tip of neurites that were enriched in SGs. These observations suggested that Rab27A and MyRIP could have a role in secretory vesicle trafficking. Consistently, the activity of Griscelli and *ashen* cy-

tototoxic T lymphocytes (CTLs) is reduced due to a defect in lytic granule secretion (Ménasché et al., 2000; Haddad et al., 2001; Stinchcombe et al., 2001). Moreover, Rab27A is associated with insulin-containing granules (Yi et al., 2002).

Here we report that Rab27A and MyRIP are associated with large dense core granules in adrenal chromaffin cells and pheochromocytoma PC12 cells and control the secretory activity in a manner that depends on the state of the actin cortex. Moreover, they reduce the mobility of SGs beneath the plasma membrane. The results are consistent with Rab27A and MyRIP bridging vesicles to F-actin and regulating the movement of vesicles within the actin cortex.

Results

Association of Rab27A and MyRIP with SGs

Upon overexpression in PC12 cells, MyRIP was previously found to be targeted to the tip of neurites where SGs accumulate (El Amraoui et al., 2002). These observations suggested that Rab27A might be responsible for the recruitment of MyRIP not only on melanosomes but also on SGs. Therefore, the expression and subcellular localization of Rab27A and MyRIP were investigated. The monoclonal anti-Rab27A antibody used in this study did not react with purified recombinant Rab3A, B, C, and D, or with Rab4, Rab11, or GFP-Rab27B transiently expressed in COS-7 cells (unpublished data). Using this antibody, we detected Rab27A in bovine adrenal chromaffin cells and in PC12 cells.

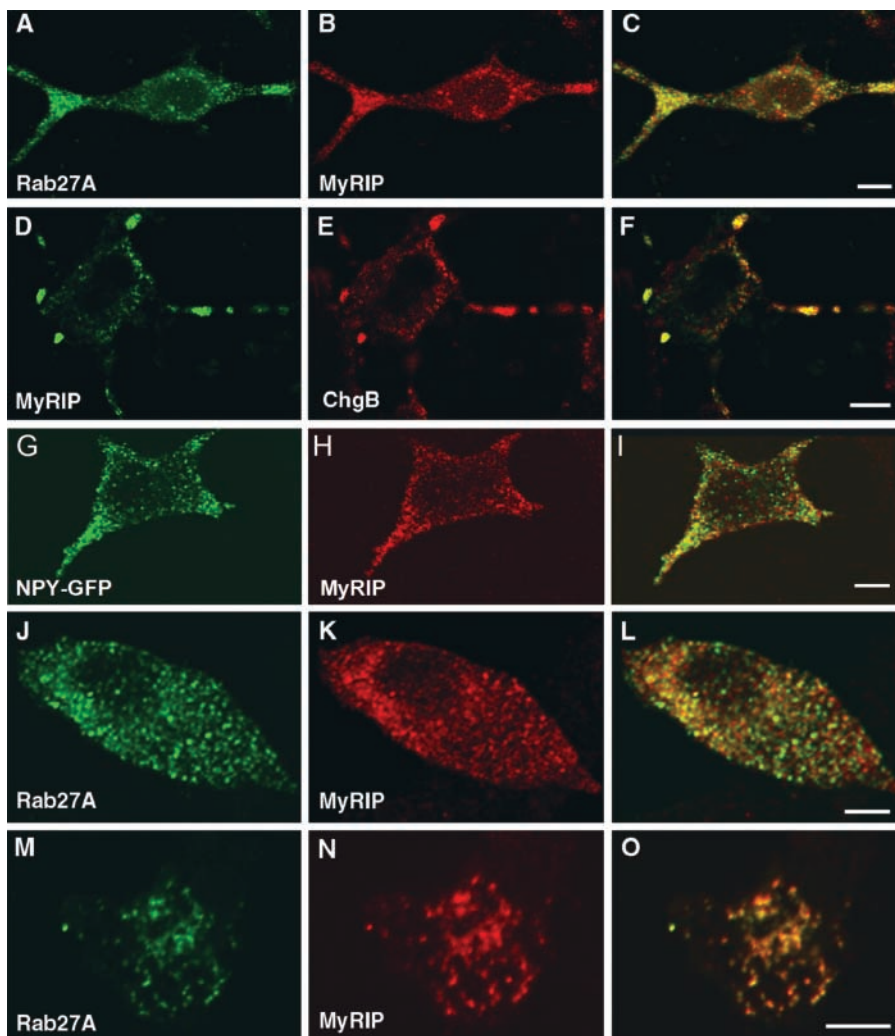


Figure 2. Confocal immunofluorescence localization of MyRIP on SGs. PC12 cells (A–I) were double imaged for endogenous Rab27A (A) and MyRIP (B) showing discrete punctate structures; most of these structures coincided (C, overlaid image), especially in the neurites. PC12 cells were transfected with pCMV-MyRIP and double imaged for MyRIP (D and H) and chromogranin B (E) or NPY-GFP (G); overlaid images indicate that MyRIP colocalized partly with chromogranin B (F) and NPY-GFP (I). Chromaffin cells (J–O) were imaged for endogenous Rab27A (J and M) and MyRIP (K and N). Many structures were double labeled, as indicated by the overlaid image of a cell sectioned close to the apex (O). Bars, 5 μ m.

The subcellular localization of Rab27A was investigated by cell fractionation of chromaffin cells. The protein was hardly detectable in the cytosol. A crude membrane fraction was separated on a sucrose gradient. Rab27A, the vesicular monoamine transporter VMAT2 and the v-SNARE protein VAMP2 were enriched in the same dense fractions of the gradient, consistent with an association of Rab27A with SGs (Fig. S1, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200302157/DC1>). In contrast, the distribution of Rab27A was not similar to that of lysosomal β -glucuronidase. MyRIP was detected in chromaffin and PC12 cell extracts as a single band (\sim 96 kD) but was not detected in gradient fractions, presumably because its membrane association is rather labile. Next, the localization of Rab27A and MyRIP was studied by confocal fluorescence microscopy. Chromaffin cells labeled with anti-Rab27A antibodies displayed a punctated labeling distributed throughout the cytoplasm. Moreover, most of the Rab27A-positive structures were also decorated by an antiserum raised against chromogranin A/B, a component of SG matrix (Fig. 1, A–C), and by an anti-dopamine β -hydroxylase, a marker of SG membrane (not depicted). The distribution of Rab27A was also analyzed in NGF-differentiated PC12 cells. As illustrated in Fig. 1 (D–F), the overall distribution of Rab27A was very similar to that of SGs (stained by an anti-chromogranin A/B antiserum), with a marked enrichment at the tip of neurites. Also,

GFP-tagged Rab27A was expressed in PC12 cells, and its localization was very similar to that of chromogranin B, stained with a monoclonal antibody (Fig. 1, G–I). In contrast, LYAAT, an amino acid lysosomal transporter (Sagné et al., 2001), displayed a very different intracellular distribution (Fig. 1, J–L). Together these results indicate that Rab27A is associated with SGs.

Next, we investigated the localization of the Rab27A effector MyRIP by confocal fluorescence microscopy. In NGF-differentiated PC12 cells, endogenous MyRIP displayed a punctate distribution very similar to that of Rab27A (Fig. 2, A–C). In addition, overexpressed MyRIP was targeted to SGs, as indicated by colocalization of MyRIP with chromogranin B (Fig. 2, D–F) and neuropeptide Y (NPY)-GFP (Fig. 2, G–I). In contrast, no significant overlap was observed between MyRIP and synaptophysin, a marker of early endosomes and synaptic-like microvesicles (not depicted). In chromaffin cells, endogenous MyRIP also displayed a punctated distribution evenly distributed throughout the cytoplasm. When the cells were double imaged for MyRIP and Rab27A, many structures contained both markers (Fig. 2, J–L). This is even more evident in Fig. 2 (M–O), which shows an apical section of a chromaffin cell. Fewer structures could be seen, and almost all of them contain both MyRIP and Rab27A. The complete overlap of the two markers in this

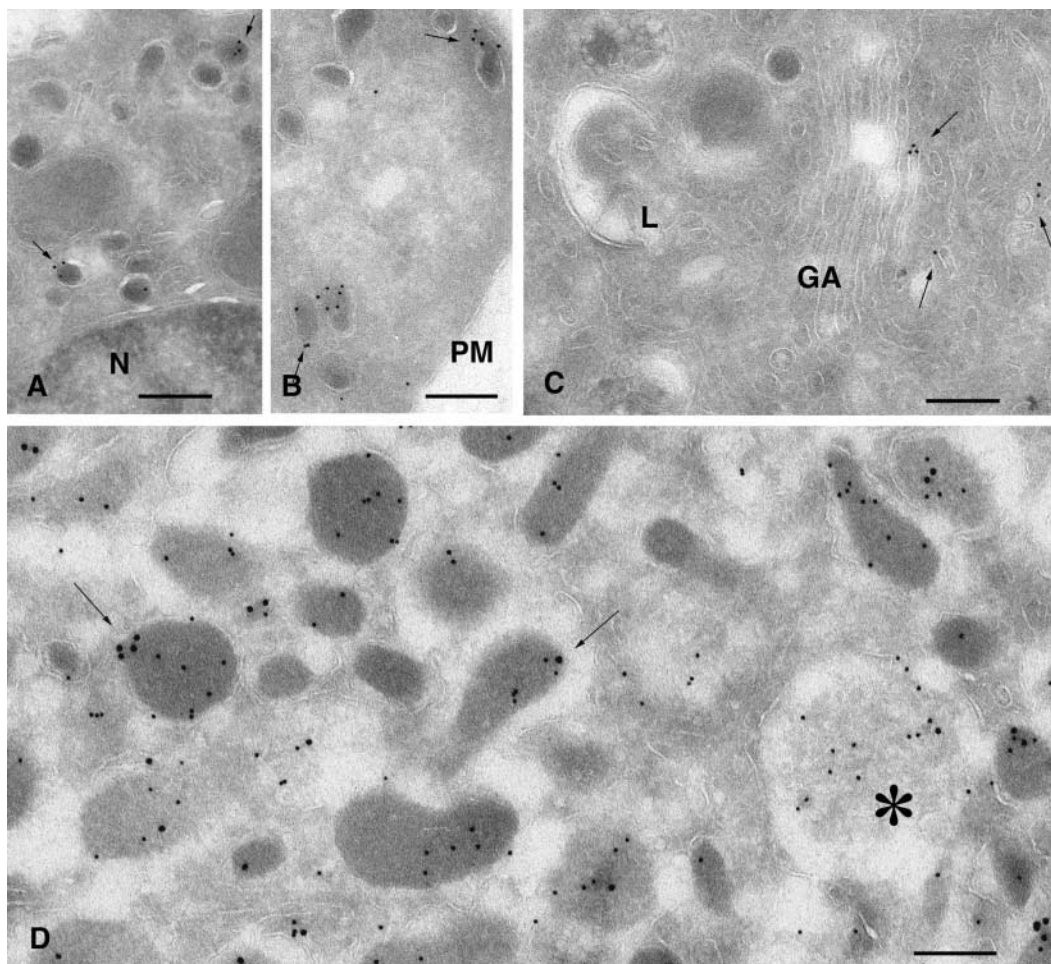


Figure 3. Ultrastructural localization of Rab27A in PC12 and chromaffin cells. Ultrathin cryosections of PC12 (A–C) and chromaffin cells (D) were single or double immunogold labeled for Rab27A (10-nm gold particles, A–C) or Rab27A (15-nm gold particles, D) and chromogranin A/B (10-nm gold particles, D). (A and B) Specific labeling of dense core granules of PC12 cells with anti-Rab27A antibodies. A restricted number of dense granules show high density of labeling for Rab27A (arrows), whereas others are negative. (C) Rab27A-positive tubulo-vesicular structures (arrows) are often observed in the Golgi region. (D) In chromaffin cells, Rab27A localizes to chromogranin-positive SGs (arrows) and to immature granules (star). N, nucleus; PM, plasma membrane; GA, Golgi apparatus. Bars, 200 nm.

section might suggest that the colocalization of MyRIP and Rab27A is better at the cell periphery. This is consistent with results obtained in PC12 cells, where MyRIP was also found on somatic structures that were not stained with anti-chromogranin or anti-Rab27A antibodies.

Finally, the localization of Rab27A was analyzed at the ultrastructural level on ultrathin cryosections of PC12 and chromaffin cells. Endogenous MyRIP could not be detected by immunoelectron microscopy with our antibodies. In PC12 cells, the majority of Rab27A-bound gold particles was associated with SGs, identified according to their electron-dense matrix and their size (Fig. 3, A and B). Rab27A labeling was also found in tubulo-vesicular structures close to the Golgi apparatus, as illustrated in Fig. 3 C. These observations suggest that Rab27A may have a role at different sites in the secretory pathway. Quantitative analysis of several sections of PC12 cells revealed that $\sim 92\%$ of Rab27A-associated gold particles were found on SGs and 8% on vesicles or tubulo-vesicular profiles located in the vicinity of the Golgi apparatus; 15% of SGs were depicted with greater than four gold particles. Double labeling of sections of chromaffin cells with anti-Rab27A

(15-nm gold particles) and anti-chromogranin (10-nm gold particles) antibodies revealed a specific association of Rab27A with SGs (Fig. 3 D). In addition, some immature granules were labeled (Fig. 3 D, asterisk). Some Rab27A-associated gold particles seemed to be located within SGs. This was observed also with another anti-Rab27A monoclonal antibody and in melanosomes (not depicted), suggesting that this observation is physiologically relevant. Previous reports showed within SGs the presence of vesicles, reminiscent of exosomes (Denzer et al., 2000), that are released in the external milieu during exocytosis (Ornberg et al., 1986).

Interaction of MyRIP with myosin-Va and actin

MyRIP was initially identified as a ligand of myosin-VIIa. However, myosin-VIIa was not detected in chromaffin and PC12 cells (unpublished data). In contrast, myosin-Va is expressed in chromaffin and PC12 cells, and its association with SGs was recently demonstrated (Rosé et al., 2003; Rudolf et al., 2003). Moreover, Fukuda and Kuroda (2002) found an interaction between full-length MyRIP and myosin-Va. We confirmed this observation using purified GST-tagged

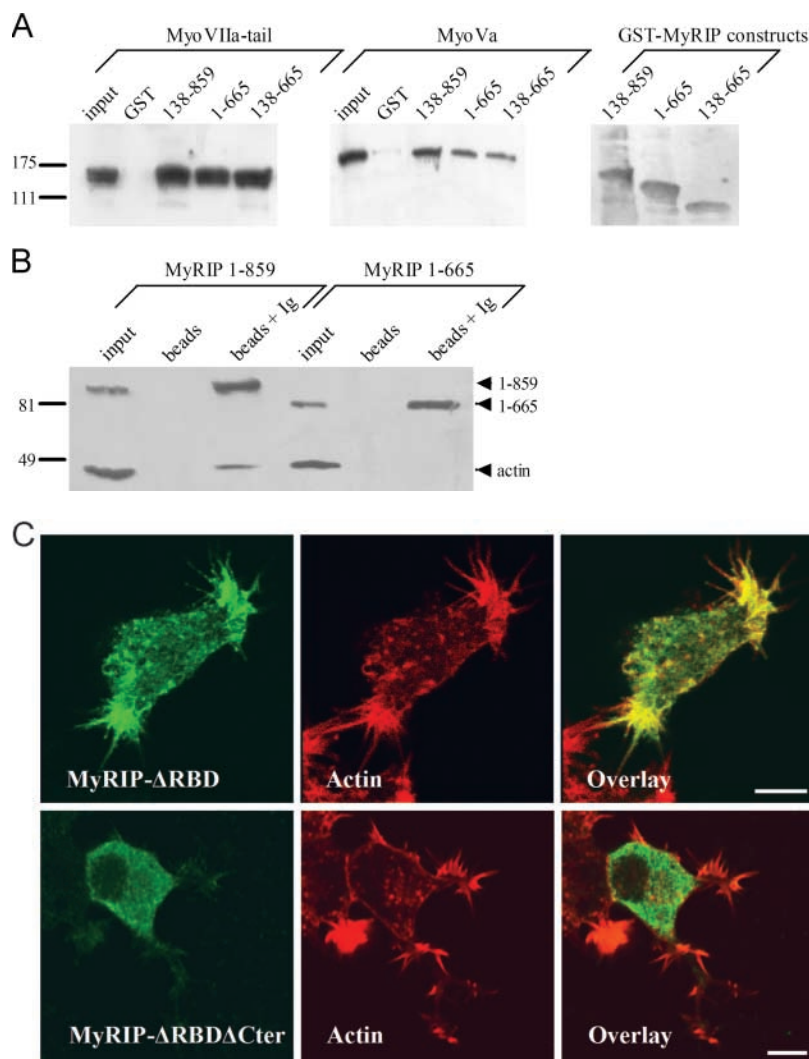


Figure 4. Interaction of MyRIP with myosin-Va and actin. (A) Binding of myosin-VIIa tail (left) or myosin-Va (middle) to purified GST or GST–MyRIP constructs immobilized on glutathione–Sepharose beads. Transfected COS-7 cells and nontransfected PC12 cells were used as a source of myosin-VIIa and myosin-Va, respectively. Cellular levels of myosin-VIIa and myosin-Va are shown in the first lane of each panel (input, 10% of the volume used in the experiment). The position of molecular weight markers is shown on the left side ($\times 10^{-3}$). The same blots were stripped and reprobed with an anti-GST monoclonal antibody to reveal the MyRIP constructs bound to the beads (right). Note that deletion of the COOH-terminal region of MyRIP had little effect on the interaction with myosins. Similar results were obtained in another experiment. (B) The COOH-terminal region of MyRIP is required for actin binding. COS-7 cells were transfected with vectors encoding full-length MyRIP (1–859) or a deletion mutant (1–665). The proteins expressed were immunoprecipitated with anti-MyRIP antibody–conjugated protein A–Sepharose (beads + Ig). Coimmunoprecipitated actin was revealed with a monoclonal antibody. Beads without antibody were used as control (beads). The amount of expressed MyRIP proteins used in the immunoprecipitation is shown on the left (input, 1/8 of the volume used). Similar results were obtained in another experiment. (C) Importance of the COOH-terminal region of MyRIP for its colocalization with F-actin. PC12 cells were transfected with MyRIP- Δ RBD (138–859) (top) or MyRIP- Δ RBD- Δ Cter (138–665) (bottom). 3 d later, cells were stained with anti-myc tag antibodies (left) or rhodamine-phalloidin (middle) and imaged by confocal immunofluorescence. The overlaid images (right) show that MyRIP- Δ RBD, but not MyRIP- Δ RBD- Δ Cter, colocalizes with F-actin.

MyRIP constructs. GST–MyRIP- Δ Cter (1–665) and Δ RBD- Δ Cter (138–665) interacted with the tail of myosin-VIIa and with myosin-Va (Fig. 4 A). However, the myosin-VIIa- and myosin-Va-binding domains of MyRIP do not overlap completely, as MyRIP (1–577) bound to myosin-VIIa (El Amraoui et al., 2002) but poorly to myosin-Va (not depicted). Fukuda and Kuroda (2002) also found an interaction between MyRIP and actin by coimmunoprecipitation. Deletion of residues 666–859 had little effect on myosin-Va binding (Fig. 4 A) but completely abolished the interaction with actin (Fig. 4 B). The importance of this COOH-terminal region for actin binding was also demonstrated by immunocytochemistry (Fig. 4 C). A deletion mutant of MyRIP lacking the Rab27a-binding domain (MyRIP- Δ RBD) colocalized with actin, whereas MyRIP- Δ RBD- Δ Cter (138–665), lacking also the COOH-terminal region required for *in vitro* actin binding, gave a diffuse cytosolic staining. This region has significant sequence similarity with melanophilin, which was shown to bind actin directly (Fukuda and Kuroda, 2002).

A role for Rab27A and MyRIP in SG exocytosis

Overexpressed Rab27A and MyRIP inhibited secretory responses of PC12 cells. Then, we investigated whether Rab27a and MyRIP may control the secretory activity of

PC12 cells. The effect of various constructs was analyzed at the cell population level by means of two secretion assays based on cotransfection of vectors encoding either a serotonin transporter (SERT) or human growth hormone (hGH). Due to the very high increase in tritiated 5-hydroxytryptamine ($[^3\text{H}]5\text{-HT}$) uptake induced by SERT, the subpopulation of transfected cells can be specifically labeled and its secretory activity determined by measuring release of $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ (Schonn et al., 2003). hGH is properly targeted to SGs and released in response to Ca^{2+} elevation (Wick et al., 1993).

Rab GTPases switch between active GTP-bound and inactive GDP-bound conformations. To investigate the function of Rab27A in regulated secretion, wild-type Rab27A or mutants defective in GTP binding (T23N) or in GTPase activity (Q78L) were transiently expressed in PC12 cells. Rab27A-T23N was supposed to interfere with the function of endogenous protein by competing for a guanine nucleotide exchange factor that catalyzes the exchange of GTP for GDP. Rab27A-Q78L was used to increase levels of active GTP-bound Rab27A. Overexpressed Rab27A and Rab27A-Q78L displayed a punctated distribution very similar to that of endogenous Rab27A (Fig. 1, G–I; Fig. S2, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200302157/DC1>). In contrast, Rab27A-T23N gave a diffuse staining of the cytosol (Fig.

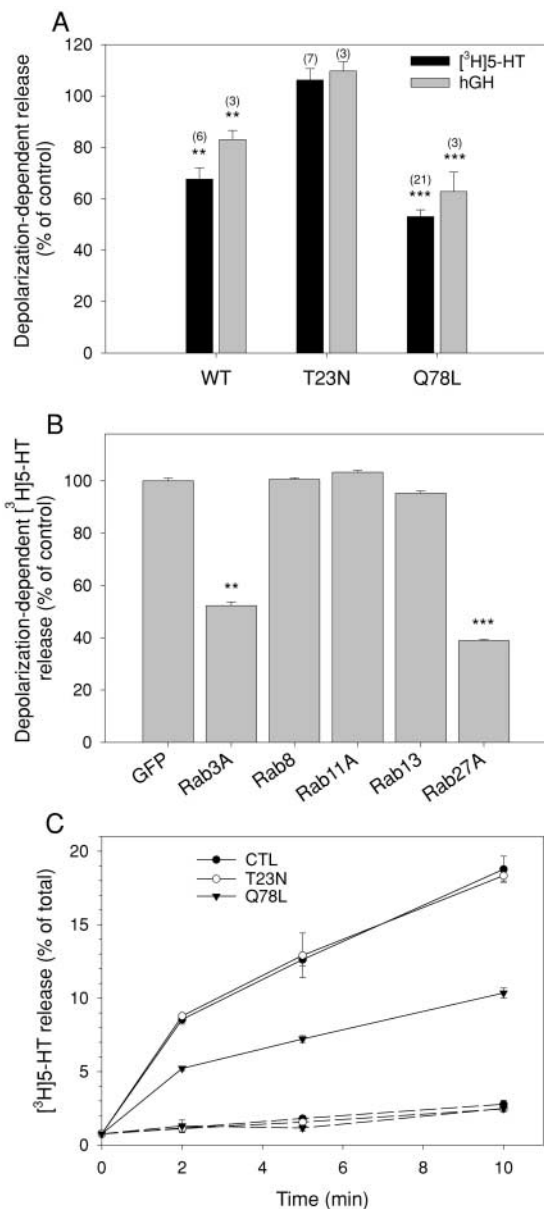


Figure 5. Rab27A controls the magnitude of secretory responses. (A) SERT-transfected (black bars) or hGH-transfected PC12 cells (gray bars) were cotransfected with vectors encoding untagged Rab27A wild type, Rab27A-T23N, or Rab27A-Q78L, as indicated. Cells were incubated for 10 min in normal or high K⁺ saline. Release in normal saline medium (2–5% of cellular [³H]5-HT) was subtracted. Results are shown as percentage of the responses of mock-transfected cells. Numbers in brackets refer to the number of independent experiments. The stimulus-dependent release of control cells ranged from 15 to 30% of cellular [³H]5-HT (mean ≈ 20%). (B) Effect of GTPase-deficient Rab3A, Rab8, Rab11, and Rab13 on secretory responses measured as in A. Rab8, Rab11, Rab13, and Rab27A were fused to GFP. Transfection of GFP was used as a control. Results are shown as percentage of the depolarization-dependent [³H]5-HT release from control cells (mean ± SEM, *n* = 3 independent experiments). Whereas Rab3A-Q81L and GFP-Rab27A-Q78L inhibit PC12 cell stimulated exocytosis, no effect was observed upon overexpression of GFP-tagged GTPase-deficient Rab8, Rab11, or Rab13. (C) [³H]5-HT release as a function of time from control cells (●) or from cells expressing Rab27A-T23N (○) or Rab27A-Q78L (▼). Cells were incubated in normal (dotted line) or high K⁺ saline (plain line). Results are expressed in percentage (mean ± SEM, *n* = 3) of total [³H]5-HT present in the cells before stimulation. Similar results were obtained in two other independent experiments.

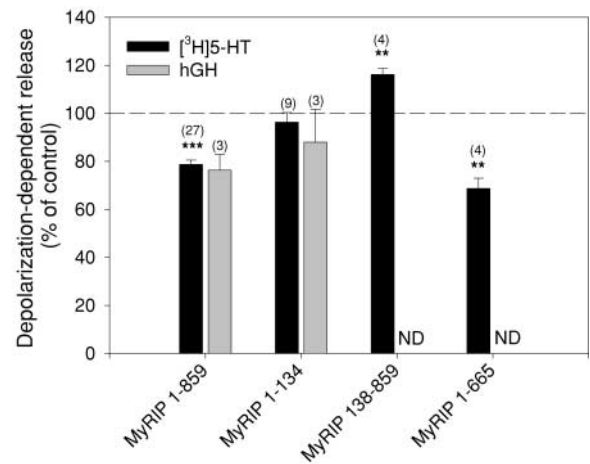


Figure 6. MyRIP controls the magnitude of secretory responses. SERT-transfected (black bars) or hGH-transfected PC12 cells (gray bars) were cotransfected with vectors encoding wild-type MyRIP (MyRIP 1–859), the Rab27A binding domain of MyRIP (MyRIP 1–134), a construct lacking the RBD (138–859), or MyRIP-ΔCter (1–665). Cells were incubated for 10 min in normal or high K⁺ saline. Release in normal saline medium was subtracted. Results are shown as percentage of the response of mock-transfected cells (mean ± SEM). The number of experiments performed is shown above the bars.

S2). Rab27A-T23N did not induce any significant change of secretory activity. In contrast, GTPase-deficient Rab27A-Q78L and, to a less extent, wild-type Rab27A have a pronounced inhibitory effect on secretion (Fig. 5 A). Similar effects of Rab27A proteins were observed in cells permeabilized with α-toxin or streptolysin-O (Rab27A WT: $-24 \pm 6.5\%$, mean ± SEM, *n* = 5 experiments; Rab27A-Q78L: $-57 \pm 4.6\%$, mean ± SEM, *n* = 3 experiments). As these pore-forming toxins bypass voltage-dependent calcium channels, the inhibitory effect of Rab27A was not due to reduced Ca²⁺ influx. Rab27A-Q78L inhibited secretory responses over a wide range of free calcium concentrations without apparent shift in the calcium sensitivity of the secretory apparatus (unpublished data). The effect of Rab27A-Q78L was compared with that of other GTPase-deficient Rab proteins. Rab3A-Q81L inhibited secretion as previously reported (Johannes et al., 1994; Schon et al., 2003), but GFP-tagged Rab8, Rab11, and Rab13 did not interfere with the secretory activity of PC12 cells (Fig. 5 B), although they were properly expressed (Fig. S3, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200302157/DC1>). Thus, the effect of Rab27A on exocytosis is specific.

Next, we investigated the effect of MyRIP on secretory responses. Overexpression of full-length MyRIP or of MyRIP-ΔCter (1–665) induced moderate but reproducible reduction of the secretory activity of PC12 cells (Fig. 6). In contrast, overexpression of MyRIP-ΔRBD (138–859) slightly increased secretory responses, while MyRIP-RBD (1–134) had no significant effect (Fig. 6).

Kinetics of secretory responses. To investigate the site of action of Rab27A-Q78L, the time course of its effect was investigated. As illustrated in Fig. 5 C, Rab27A-Q78L had similar inhibitory effects at various time points (2, 5, and 10 min of stimulation). Similar results were obtained for MyRIP (not depicted). The kinetics of secretory responses was determined

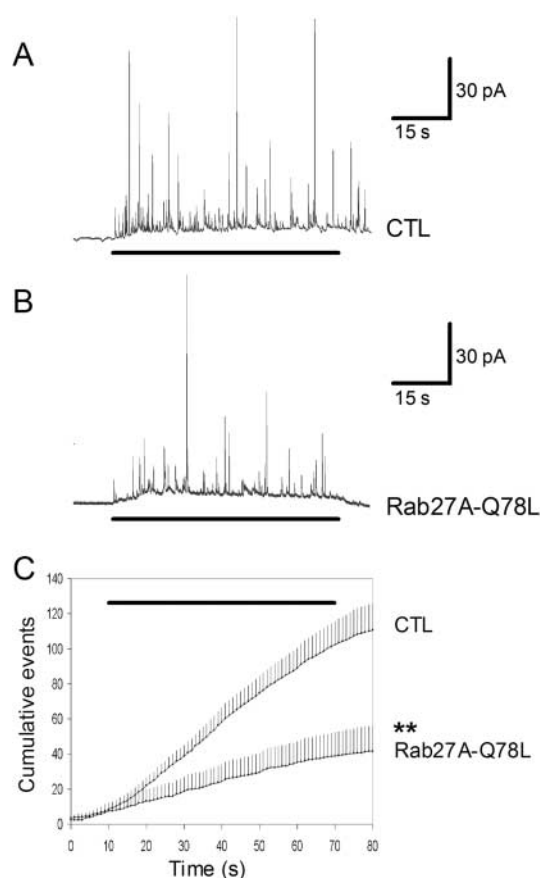


Figure 7. Rab27A-Q78L reduces the frequency of amperometric spikes in chromaffin cells. Secretory responses of single adrenal chromaffin cells were monitored by carbon fiber amperometry. (A) Amperometric trace recorded from a GFP-transfected (CTL) chromaffin cell stimulated by local application of 10 μ M nicotine (indicated by the bar below the trace). (B) Secretory response of a Rab27A-Q78L-expressing cell. (C) The cumulative number of spikes is plotted against time. Shown are the mean values (+SEM) from 17 cells (CTL) and 6 cells (Rab27A-Q78L). The bar above the traces indicates the presence of nicotine. The significance of difference was calculated with Mann-Whitney test.

more accurately by means of carbon fiber amperometry on single chromaffin cells. Exocytosis is resolved by this technique as a series of current spikes, each spike being produced by the oxidation of the content of a single vesicle (Wightman et al., 1991). Chromaffin cells were cotransfected with Rab27A-Q78L or MyRIP and GFP (the latter being used to identify transfected cells). Cells expressing GFP only were used as controls. Overexpression of Rab27A-Q78L (Fig. 7) or MyRIP (Fig. 8) induced a significant reduction in spike frequency consistent with a reduction of the sustained phase of the release process. Rab27A and MyRIP might be implicated in the motion of vesicles toward the plasma membrane, the docking step, or the priming reaction, which makes vesicles ready to fuse.

Rab27A and MyRIP did not affect spontaneous release.

We did not detect any increase in the spontaneous release of [3 H]5-HT in Rab27A- or MyRIP-transfected cells compared with control cells during 10-min (Fig. 5 C) or 1-h (not depicted) incubations. However, as serotonin is not stably entrapped within SGs (Schonn et al., 2003), spontaneous release of [3 H]5-HT during long periods of time

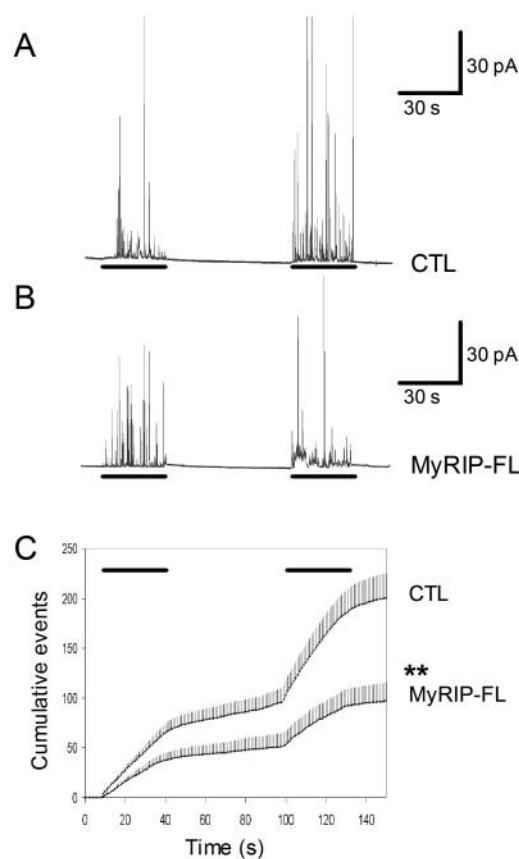


Figure 8. Overexpression of MyRIP reduces the frequency of amperometric spikes in chromaffin cells. Secretory responses of single adrenal chromaffin cells were monitored by carbon fiber amperometry. (A) Amperometric trace recorded from a GFP-transfected (CTL) chromaffin cell stimulated by local application of high K^+ (55 mM) saline (indicated by bars below the trace). (B) Secretory responses of a wild-type MyRIP (MyRIP-FL)-transfected cell. (C) The cumulative number of spikes is plotted against time. Shown are the mean values (+SEM) from 18 cells (CTL) and 16 cells (MyRIP-FL). The bars indicate the application of high K^+ . The significance of difference was calculated with Mann-Whitney test.

could not be used as a nonambiguous index of constitutive exocytosis. Released hGH was thus measured in the cell culture media 3 d after transfection. Compared with control cells, levels of hGH released from Rab27A WT- or Q78L-expressing cells were not significantly modified (not depicted). Furthermore, amperometric recordings did not detect any increase in spike frequency in the absence of stimulus (Figs. 7 and 8). These results suggest that the inhibitory effect of Rab27A and Rab27A-Q78L on secretory responses did not result from an increased release activity in resting conditions.

Secretory effects of Rab27A and MyRIP depend on the state of actin cortex

Biochemical data are consistent with a role for Rab27A and MyRIP in linking vesicles to F-actin. Entrapment of SGs within the actin cortex might thus be responsible for their inhibitory effect on secretory responses. To test this hypothesis, the effect of Rab27A and MyRIP on secretory responses was measured in cells treated with drugs that interfere with

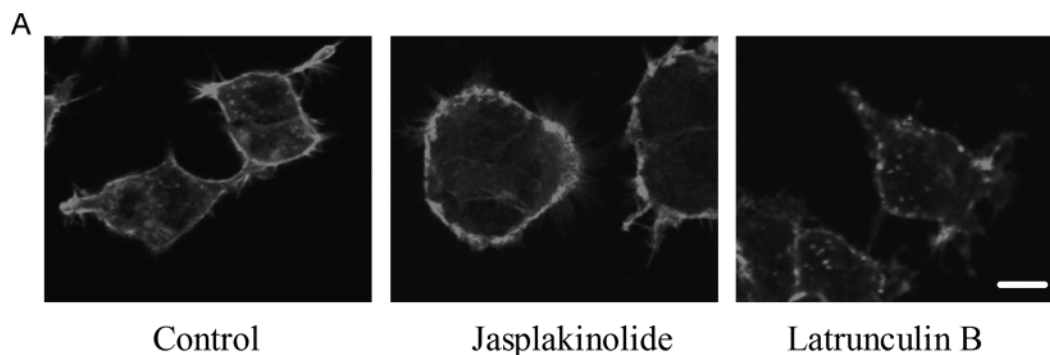
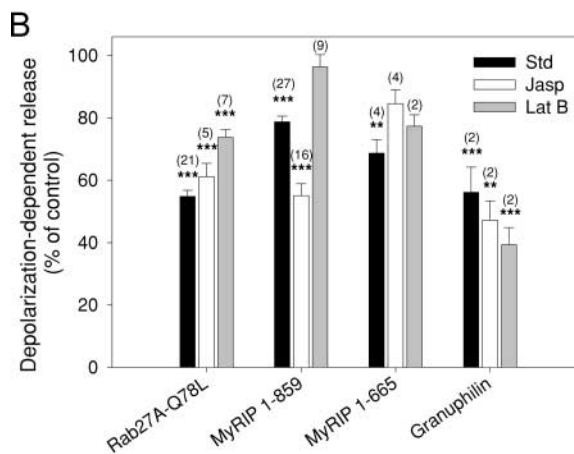


Figure 9. The effects of Rab27A-Q78L and MyRIP on secretion depend on the state of the actin cortex.

(A) Rhodamine-phalloidin staining of the actin cortex of PC12 cells. Compared with control conditions (left), the thickness of actin is reduced upon latrunculin B treatment (middle) and increased by jasplakinolide (right). (B) The secretory activity of PC12 cells transfected with vectors encoding GFP (as control), Rab27A-Q78L, wild-type MyRIP (MyRIP 1–859), MyRIP- Δ Cter (1–665), or granuphilin was measured as in Fig. 5 by means of the [3 H]5-HT release assay. Cells were incubated without addition of drug (Std, black bars) or in the presence of 1 μ M jasplakinolide (Jasp, open bars) or 5 μ M latrunculin B (Lat B, gray bars) for 20 min before and during stimulation of secretion. The effect of the different proteins on secretion was expressed, after subtracting the basal release of [3 H]5-HT in normal saline, as percentage of the stimulus-dependent secretory response of GFP-transfected cells measured under the same conditions (i.e., in the absence of drug, in the presence of jasp, or in the presence of lat B). Shown are the results (mean \pm SEM) of several independent experiments (the number of experiments is shown above the bars). Latrunculin B significantly reduced ($P < 0.001$) the inhibitory effects of Rab27A-Q78L and MyRIP on secretion, whereas jasplakinolide increased that of MyRIP ($P < 0.001$). The net release of GFP-transfected cells was $19 \pm 2\%$ of cellular [3 H]5-HT in the absence of drug, $20 \pm 2.2\%$ in the presence of jasplakinolide, and $31 \pm 3\%$ in the presence of latrunculin B.



actin polymerization. Latrunculins favor actin depolymerization (Spector et al., 1983; Lang et al., 2000), whereas jasplakinolide promotes actin polymerization (Fig. 9 A). Under the conditions used, latrunculin B increased the secretory activity, while jasplakinolide had no significant effect on secretion. In latrunculin B-treated cells, the inhibitory effect of Rab27A-Q78L was significantly reduced compared with the one observed in the absence of drug (Fig. 9 B). Latrunculin B also reduced the effect of MyRIP. On the other hand, the inhibition of secretion induced by MyRIP overexpression was much stronger after jasplakinolide treatment than in standard conditions (Fig. 9 B). This effect is probably mediated by direct interaction of MyRIP with F-actin because it was not observed with MyRIP- Δ Cter. The effect of granuphilin, another putative effector of Rab27A, was not increased by jasplakinolide (Fig. 9 B). In contrast to drugs that act on the actin cortex, microtubule depolymerization by nocodazole did not modify the effect of Rab27A and MyRIP (not depicted). The inhibitory effect of Rab27A and MyRIP, which does not by itself modify the actin cortex (not depicted), is thus partly dependent on the integrity and dynamics of the cytoskeleton.

Rab27A and MyRIP restrict granule motion

Evanescent wave fluorescence microscopy (EW-FM) allows observation of fluorescent markers in a thin optical section

near a glass–water interface. PC12 cells cultured on the glass interface were transfected with a NPY–GFP construct to label SGs and imaged with this technique. Under these conditions, the fluorescent SGs close to the plasma membrane were easily observed (Fig. 10 A), and their individual behavior was recorded with a CCD camera (Fig. 10 B). The intensity of the evanescent wave decreased exponentially with the distance from the interface with a decay constant in the cell adjusted to 200 nm. According to previous studies in PC12 cells (Lang et al., 2000), most of SGs imaged by this technique are located in the actin cortex.

The mobility of SGs in unstimulated cells was analyzed in 1-min sequences of 120 frames (Video 1, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200302157/DC1>). Most of the vesicles had limited movements (Fig. 10 B, arrowhead), but some moved on longer distances (Fig. 10 B, arrow). The x,y trajectories were monitored using a single particle tracking software (Fig. 10, C and D), and the mean x,y diffusion coefficients ($D_{x,y}$) were derived from mean square displacement (MSD) analysis.

Rab27A-Q78L or various MyRIP constructs were transiently expressed in PC12 cells together with NPY–GFP (see Videos 1–5 for representative examples, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200302157/DC1>). All SGs that could be followed for >15 s were tracked (150–700 SGs from 15–60 cells per group). Expression of

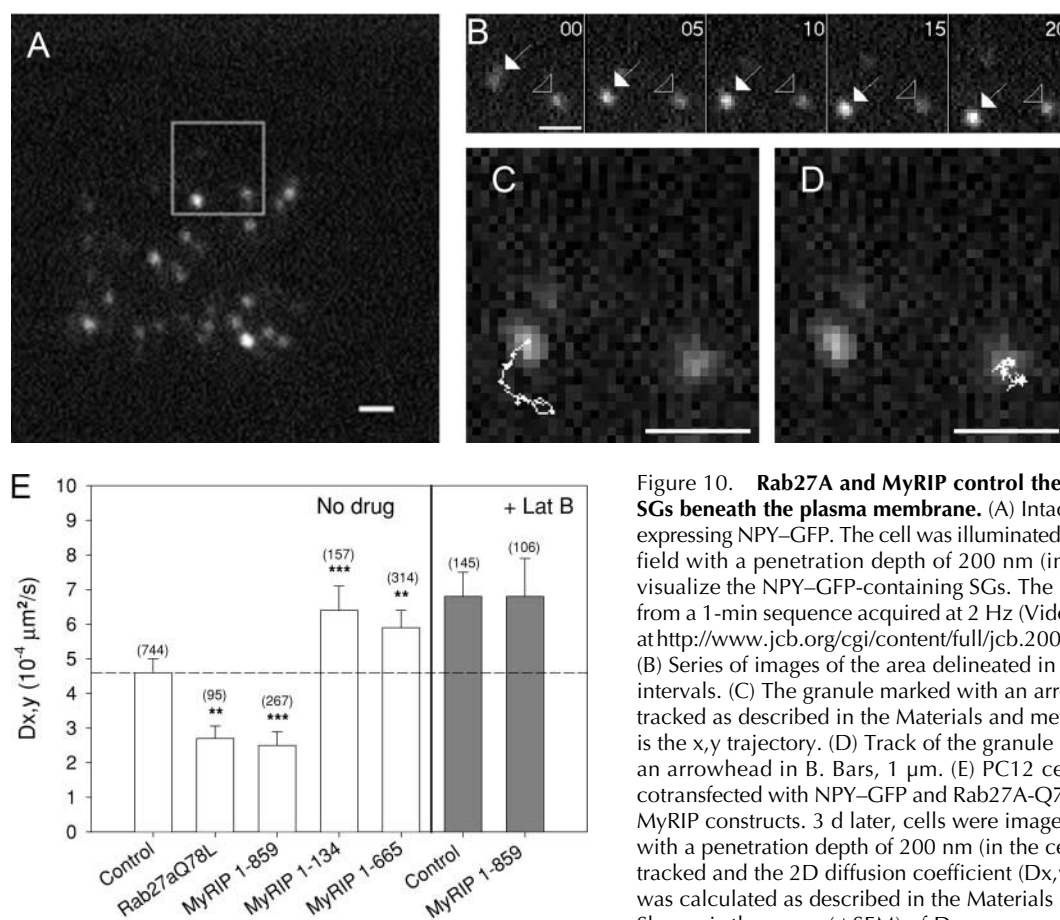


Figure 10. Rab27A and MyRIP control the motion of SGs beneath the plasma membrane. (A) Intact PC12 cell expressing NPY-GFP. The cell was illuminated by evanescent field with a penetration depth of 200 nm (in the cell) to visualize the NPY-GFP-containing SGs. The image is taken from a 1-min sequence acquired at 2 Hz (Video 5, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200302157/DC1>). (B) Series of images of the area delineated in A taken at 5-s intervals. (C) The granule marked with an arrow in B was tracked as described in the Materials and methods. Shown is the x,y trajectory. (D) Track of the granule marked with an arrowhead in B. Bars, 1 μm . (E) PC12 cells were cotransfected with NPY-GFP and Rab27A-Q78L or different MyRIP constructs. 3 d later, cells were imaged by EW-FM with a penetration depth of 200 nm (in the cell). SGs were tracked and the 2D diffusion coefficient ($D_{x,y}$) of each SG was calculated as described in the Materials and methods. Shown is the mean (\pm SEM) of $D_{x,y}$ measured in mock-transfected (Control) and Rab27A-Q78L, MyRIP (1-859), MyRIP-RBD (1-134), and MyRIP- Δ Cter (1-665) transfected cells. Latrunculin B (Lat B, right) increased the mean $D_{x,y}$ of control cells. Moreover, under these conditions, the mobility of SGs from MyRIP-expressing cells was not different from that of mock-transfected cells. The number of tracked SGs is indicated above the bars. The significance of the differences was measured with Mann-Whitney U test.

Rab27A-Q78L or MyRIP clearly shifted the distribution of $D_{x,y}$ toward lower values (not depicted) and lowered the mean diffusion coefficient (Fig. 10 E), indicating reduced mobility of SGs. In contrast, expression of MyRIP-RBD and MyRIP- Δ Cter increased the mean diffusion coefficient. None of these proteins affected the mean number of SGs per area unit (unpublished data). In latrunculin-treated cells, SG mobility was enhanced but was insensitive to MyRIP overexpression (Fig. 10 E, right).

Discussion

The data presented here suggest that Rab27A and MyRIP provide a link between SGs and F-actin, and control short-range movements of SGs beneath the plasma membrane and their access to exocytotic sites. Our results indicate that MyRIP and Rab27A are associated with SGs. This conclusion is supported by different approaches. First, Rab27A cofractionates with VMAT2 and VAMP2 in sucrose gradients of chromaffin cell extracts. Second, Rab27A and MyRIP colocalize with chromogranins in confocal sections of PC12 and chromaffin cells. Third, Rab27A colocalizes with SGs by immunoelectron microscopy. Interestingly, in several cases, Rab27A-associated gold particles were found in

small clusters, suggesting that Rab27A may define microdomains on SGs, as was proposed for Rab5 on endosomes (Sönnichsen et al., 2000). The association of Rab27A with SGs is consistent with recent findings obtained by Fukuda et al. (2002a). Rab27A and Rab27B have also been found on insulin-containing granules (Yi et al., 2002; Zhao et al., 2002) or platelet-dense or α granules (Barral et al., 2002). Moreover, Rab27A is involved in the regulation of CTL exocytosis at the immunological synapse (Ménasché et al., 2000; Haddad et al., 2001; Stinchcombe et al., 2001). Therefore, Rab27A and maybe Rab27B are associated with a broad range of secretory vesicles, and not only with typical lysosome-related organelles.

In agreement with the localization of Rab27A on SGs, the Rab27A-binding protein MyRIP colocalized with Rab27A and SG markers. The granular localization of MyRIP depends on its NH₂-terminal Rab27A-binding domain because truncated constructs lacking this domain are mislocalized (El-Amraoui et al., 2002; Fig. 4 C).

Studies on Griscelli syndrome or *ashen* CTLs lacking Rab27A revealed a defect in lytic granule exocytosis, suggesting that Rab27A is an essential component of the secretory machinery. During completion of this study, Fukuda et al. (2002a) reported that overexpression of wild-type Rab27A

increased the secretory activity of PC12 cells. Similar effects of Rab27A on insulin secretion were also reported recently (Yi et al., 2002). In chromaffin and PC12 cells, we found by several approaches that Rab27A and, more especially, GTPase-deficient Rab27A (that is properly targeted to SGs; Fig. S2) reduced the magnitude of the secretory response (Figs. 5–9). Rab27A-Q78L reduced not only the amount of released secretory products but also the frequency of release events, as measured by carbon fiber amperometry. This apparent discrepancy might result from differences in assays used to measure secretion, from the relative importance of various Rab27A effectors in different cells, or from a rate-limiting effect of GTP hydrolysis by Rab27A. An increased probability of spontaneous fusion does not seem to account for the observed inhibition of stimulus-dependent release by Rab27A and Rab27A-Q78L, as was proposed recently by Schlüter et al. (2002) for Rab3A, another GTPase associated with SGs. Indeed, we did not detect any significant increase in release activity in the resting state.

Our observations suggest that MyRIP mediates, at least partly, the effect of Rab27A on secretion and provides a physical link between SGs and actin. Indeed, both proteins reduced the “sustained” component of release that involves recruitment of vesicles from the “reserve” pool. Moreover, both Rab27A- and MyRIP-induced effects on secretion were modulated by drugs that affect the actin cortex. Latrunculin B, which reduces the thickness of the actin cortex, also reduced the inhibitory effects of Rab27A-Q78L and MyRIP, while the actin-stabilizing drug jasplakinolide strongly strengthened the effect of MyRIP (Fig. 9). Finally, both MyRIP and Rab27A-Q78L restrict the motion of SGs in the actin-rich region of the cell imaged by EW-FM, whereas MyRIP-RBD and MyRIP- Δ Cter, which are supposed to reduce the association of endogenous MyRIP with Rab27A, enhanced the mobility of SGs (Fig. 10 E). Latrunculin was found to increase SG mobility in mock-transfected cells, in agreement with F-actin acting as a barrier, and to prevent the effect of MyRIP on SG motion, in agreement with MyRIP tethering SGs to F-actin.

Previous studies revealed that SGs are captured at the cell periphery by a process involving both microfilaments and microtubules (Rudolf et al., 2001). MyRIP and Rab27A may play a role in SG capture similar to that of Rab27A/melanophilin/myosin-Va in the actin-dependent retention of melanosomes. However, if actin filaments may favor the retention of SGs at the cell periphery, they also hamper the diffusion of SGs toward the plasma membrane, as indicated by the increase in SG mobility and release induced by latrunculin. MyRIP may link SGs to actin via myosin-Va, which was recently shown to favor the dispersion of immature SGs within the actin cortex (Rudolf et al., 2003) and to be involved in secretion (Rosé et al. 2003). Recruitment of a molecular motor might indeed promote the motion of SGs within the actin cortex. MyRIP may also link SGs to actin filaments via a myosin-independent mechanism involving the COOH-terminal region of MyRIP (Fig. 4; Fig. S4, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200302157/DC1>). This region displays significant sequence similarity with the actin-binding domain of melanophilin, suggesting that MyRIP may also bind F-actin directly. Our data indicate that this myosin-independent binding of MyRIP to actin is responsible for the

restricted mobility of SGs. Indeed, SG motion was reduced by MyRIP but increased by MyRIP- Δ Cter, which binds to myosin-Va but not to actin (Fig. 4). The motion of SGs within the actin cortex thus depends on the dynamics of actin remodeling and of Rab27/MyRIP/actin interaction.

The inhibition of secretion observed upon expression of Rab27A or MyRIP is apparently correlated with the restricted motion of SGs within the actin cortex. In the case of MyRIP, both effects display the same dependence on actin organization. Clearly, increasing the degree of actin polymerization (by jasplakinolide) and the interaction of SGs with actin (by MyRIP) is detrimental to the secretory process, most likely by preventing the access of SGs to release sites. However, MyRIP- Δ Cter, which increased SG mobility, also reduced the magnitude of the secretory response. In this case, the effect on secretion was not strengthened by jasplakinolide. This result suggests that MyRIP may interfere with the secretory process via another mechanism. This hypothesis deserves further study. It will also be interesting to investigate the putative function of MyRIP in other secretory cells such as CTLs and neurons.

Materials and methods

Materials

The rabbit anti-MyRIP antibody and the anti-myosin-VIIa antibody were described previously (El Amraoui et al., 2002). Anti-LYAAT and anti-VMAT2 rabbit antisera were provided by B. Gasnier and C. Sagné (CNRS, Institut de Biologie Physico-Chimique); the anti-chromogranin B monoclonal antibody was a gift of W. Huttner (Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden, Germany); the anti-myosin-Va was provided by R. Cheney (University of North Carolina, Chapel Hill, NC). Anti-Rab27A monoclonal antibody was from Transduction Laboratories; anti-chromogranin A/B polyclonal antibody was from Abcam; anti-VAMP2 was from Synaptic Systems; anti-actin was from Sigma-Aldrich; and the myc tag 9B11 antibody was from Cell Signaling Technology.

Plasmid encoding rat SERT (pcDNA3-SERT) and NPY-GFP were provided by R. Blakely (Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN) and W. Almers (Oregon Health Sciences University, Portland, OR), respectively. pcDNA3-granuphilin was a gift of R. Regazzi (University of Lausanne, Lausanne, Switzerland). pEGFP-C1 was from BD Biosciences Clontech. Other plasmids encoding MyRIP and Rab27A constructs were described previously (El-Amraoui et al., 2002; Ménasché et al., 2003). Streptolysin-O and α -toxin were obtained from S. Bhakdi (Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany) (Bhakdi et al., 1993). Latrunculin B and jasplakinolide were from Calbiochem. Other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich.

Cell culture and transfection

Primary dissociated chromaffin cells from bovine adrenal medulla were prepared by retrograde collagenase perfusion and cultured as previously described (Darchen et al., 1990). PC12 cells were cultured and transfected as described previously (Schonn et al., 2003). Where indicated, NGF (50 μ g/ml) was added to the culture medium. COS-7 cells were cultured in DME supplemented with 10% FBS at 37°C under 5% CO₂. Chromaffin and COS-7 cells were transfected by electroporation using Optimix electroporation kit (Equibio). In brief, freshly prepared cells were suspended in Optimix buffer A and collected by centrifugation (800 *g*, 10 min). Cells (1.5 \times 10⁶) were resuspended in 55 μ l Optimix buffer B containing vector DNAs (5 μ g). A single electric shock (PC12: 650 V/cm, 24 ms; COS: 625 V/cm, 8 \times 3 ms) was applied using a PS10 electropulsator (Jouan). Electroporated cells were immediately recovered in warm culture medium and plated onto polylysine-coated glass coverslips. Experiments were generally performed 3 d after transfection.

Immunoelectron microscopy

PC12 and chromaffin cells were fixed with 2% paraformaldehyde in 0.2 M phosphate buffer, pH 7.4, for 1 h at room temperature. Cells were embedded in 10% gelatin, infused in 2.3 M sucrose, and frozen in liquid nitrogen

as described in detail previously (Raposo et al., 1997). Ultrathin cryosections were prepared with a Leica FCS ultracryomicrotome (Leica) and single and double immunogold labeled with a mouse monoclonal anti-Rab27A antibody and a rabbit polyclonal anti-chromogranin A/B according to Slot et al. (1991). A rabbit anti-mouse IgG was used after the first incubation with the monoclonal anti-Rab27A antibody. Protein A-gold conjugates (PAG 10 and PAG 15) were purchased from the Department of Cell Biology, Utrecht University, Utrecht, Netherlands. Relative quantitation of the immunogold labeling for Rab27A was performed directly under the electron microscope by counting 650 gold particles associated with the different subcellular compartments of PC12 cells. 560 granules were analyzed for the presence of Rab27A.

Interaction assays

GST and GST-MyRIP constructs were expressed in *E. coli* BL21 cells and purified by affinity chromatography onto glutathione-Sepharose (Amersham Biosciences) using standard procedures.

Pull Down. Myosin-VIIa tail (El Amraoui et al. 2002) was expressed in COS-7 cells. Transfected COS-7 cells or PC12 cells were scrapped, sonicated, and solubilized at 4°C for 30 min in a buffer containing 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 25 mM Tris-Cl, pH 7.5, 2 mM ATP, and a cocktail of proteases inhibitors. After centrifugation (12,000 *g*, 15 min), supernatants (0.5–1 mg protein) were incubated for 1 h at 4°C under agitation with 1 nmol of purified GST or GST-MyRIP constructs prebound to 150 μ l glutathione-Sepharose beads. The beads were washed three times in 150 mM NaCl, 25 mM Tris-Cl, pH 7.5, and eluted in Laemmli sample buffer. Starting material and eluates were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting for the presence of myosin-Va or -VIIa.

Coimmunoprecipitation. COS-7 cells were transfected 2 d before the experiment with vectors encoding myc-tagged MyRIP or MyRIP- Δ Cter (1–665). Cells were lysed as described above. Extracts were incubated with protein A-Sepharose beads (100 μ l wet volume; Amersham Biosciences) conjugated with or without affinity-purified anti-MyRIP antibody. After three washes, the eluates were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting for the presence of MyRIP (with an anti-c-myc tag antibody) or actin.

Secretion assays

The [³H]5-HT release assay has been described previously (Schonn et al., 2003). In brief, PC12 cells were transfected with the serotonin transporter SERT, loaded with [³H]5-HT (5–20 Ci/mmol; Amersham Biosciences). Basal release was measured in Locke's solution containing (in mM) NaCl 154, KCl 5.5, glucose 5.6, NaHCO₃ 3.5, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.2, Hepes 15, and 0.2% BSA, pH 7.4, adjusted with NaOH supplemented with 1 μ M clomipramine. Secretion was measured at 37°C in high K⁺ Locke's solution (55 mM K⁺ with Na⁺ reduced to 104.5 mM) in the presence of 1 μ M clomipramine. After 2–10 min, the radioactivity released in the medium and remaining in the cells was measured. Alternatively, cells were rinsed twice with Ca²⁺-free Locke's solution and permeabilized for 4 min at 37°C with 20 μ M digitonin or 22 U streptolysin-O in (in mM) potassium glutamate 139, Pipes 20, HEDTA 2, EGTA 2, free Mg²⁺ 1, ATP 2, plus 0.3% BSA and pH adjusted to 7 using KOH. Secretion was then elicited in the same medium supplemented with 30 μ M free Ca²⁺, for 5 min at 37°C. Free Ca²⁺ concentrations were calculated according to Föhr et al. (1993) using calcv.22 software. Where indicated, cells were treated with 1 μ M jaspilkinolide or 5 μ M latrunculin B for 20 min before being stimulated to secrete (in the continuing presence of the drug). The hGH release assay and amperometric recordings were performed as described previously (Schonn et al., 2003).

EW-FM

An upright microscope (Olympus BX50WI) has been adapted to EW-FM by the prism approach (Axelrod, 1981). To excite fluorescence, light from an argon laser set at 488 nm (Spectra Physics 177-G02) entered radially a hemispheric BK7 glass prism and struck its planar face at a supercritical angle. The angle was adjustable by means of telecentric optics to be described elsewhere, and the evanescent field decay length was calculated assuming a refractive index of 1.37 for the cellular medium (experimentally determined). NPY-GFP-transfected PC12 cells cultured on polylysine-coated glass coverslips were observed in Locke's solution. Coverslips were optically coupled to the planar face of the prism with immersion oil (Carl Zeiss Microimaging, Inc.). The laser intensity was attenuated to \sim 1 mW, and illumination was restricted to image acquisition by a shutter coupled to the camera. The cells were observed through a water immersion objective 60X 0.9 NA (Olympus), and the images were captured with a CDD camera (Photometrics CoolSnap HQ; Roper Scientific). In the present work, frames were acquired at 2 Hz in stacks of 120 images. Exposure

times were of 100–300 ms, depending upon the signal to noise ratio, and under these conditions, <5% photobleaching occurred.

Analysis of SG motion

The positions of SGs in an *x,y* plane parallel to the membrane glass interface were determined using software modules provided by Metamorph (Universal Imaging). Occasionally, the image stacks were processed by a long pass filter (Steyer and Almers, 1999) before tracking the vesicles. For tracking, SGs that did not collide with neighboring granules and that stay bright for at least 30 images (15 s) were selected. A threshold brightness was then chosen, resulting in binary stacks where SGs appeared as single continuous regions of bright pixels. The position of the tracked SGs was determined as the mass center of these contiguous bright pixels. The trajectories were derived from the SG positions on each frame. For each SG trajectory, the MSD in the *x,y* plane was calculated according to Steyer and Almers (1999). Plots of MSD as a function of Δt were linear for $\Delta t < 5$ s, and a two-dimension diffusion constant $D_{x,y}$ was derived from the slope of the curve.

Statistical analyses

Significance of differences was calculated with *t* test or Mann-Whitney *U* test; *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001.

Online supplemental material

The supplemental material (Figs. S1–S4, Videos 1–5, and supplemental Materials and methods) is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200302157/DC1>. Fig. S1 shows the presence of Rab27A in subcellular fractions enriched in SGs. Fig. S2 shows the distribution of Rab27A constructs in PC12 cells. Fig. S3 illustrates the cellular expression of the different constructs used in this study. Fig. S4 depicts how Rab27A and MyRIP may bridge SGs to actin. The videos illustrate the effect of Rab27A and MyRIP on SG motion. Plasmid constructions and protocols used for immunocytochemistry and subcellular fractionation are described in the supplemental Materials and methods.

We thank R.E. Cheney and E. Coudrier for helpful discussion, M.C. Seabra for anti-Rab27a antibodies used in some experiments, and A. Schmidt for critical reading of the manuscript.

J.-S. Schonn was supported by a fellowship from the Fondation de la Recherche Médicale, and S. Huet was supported by the Direction Générale de l'Armement. This work was supported by a grant from the Ministère de la Recherche (DRAB).

Submitted: 25 February 2003

Accepted: 4 September 2003

References

- Axelrod, D. 1981. Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *J. Cell Biol.* 89:141–145.
- Bahadoran, P., E. Aberdam, F. Mantoux, R. Busca, K. Bille, N. Yalman, G. de Saint-Basile, R. Casaroli-Marano, J.P. Ortonne, and R. Ballotti. 2001. Rab27a: a key to melanosome transport in human melanocytes. *J. Cell Biol.* 152:843–850.
- Barral, D.C., J.S. Ramalho, R. Anders, A.N. Hume, H.J. Knapton, T. Tolmachova, L.M. Collinson, D. Goulding, K.S. Authi, and M.C. Seabra. 2002. Functional redundancy of Rab27 proteins and the pathogenesis of Griscelli syndrome. *J. Clin. Invest.* 110:247–257.
- Bhakdi, S., U. Weller, I. Walev, E. Martin, D. Jonas, and M. Palmer. 1993. A guide to the use of pore-forming toxins for controlled permeabilization of cell membranes. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 182:167–175.
- Darchen, F., A. Zahraoui, F. Hammel, M.P. Monteils, A. Tavitian, and D. Scherman. 1990. Association of the GTP-binding protein Rab3A with bovine adrenal chromaffin granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:5692–5696.
- Denzer, K., M.J. Kleijmeier, H.F. Heijnen, W. Stoorvogel, and H.J. Geuze. 2000. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J. Cell Sci.* 113(Pt 19):3365–3374.
- El-Amraoui, A., J.S. Schonn, P. Kussel-Andermann, S. Blanchard, C. Desnos, J.P. Henry, U. Wolftrum, F. Darchen, and C. Petit. 2002. MyRIP, a novel Rab effector, enables myosin VIIa recruitment to retinal melanosomes. *EMBO Rep.* 3:463–470.
- Föhr, K.J., W. Warchol, and M. Gratzl. 1993. Calculation and control of free divalent cations in solutions used for membrane fusion studies. *Methods Enzymol.* 221:149–157.
- Fukuda, M., and T.S. Kuroda. 2002. Slac2-c (synaptotagmin-like protein homo-

- logue lacking C2 domains-c), a novel linker protein that interacts with Rab27, myosin Va/VIIa, and actin. *J. Biol. Chem.* 277:43096–43103.
- Fukuda, M., E. Kanno, C. Saegusa, Y. Ogata, and T.S. Kuroda. 2002a. Slp4-a/granuphilin-a regulates dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 277:39673–39678.
- Fukuda, M., T.S. Kuroda, and K. Mikoshiba. 2002b. Slac2-a/melanophilin, the missing link between Rab27 and myosin Va: implications of a tripartite protein complex for melanosome transport. *J. Biol. Chem.* 277:12432–12436.
- Haddad, E.K., X. Wu, J.A. Hammer III, and P.A. Henkart. 2001. Defective granule exocytosis in Rab27a-deficient lymphocytes from Ashen mice. *J. Cell Biol.* 152:835–842.
- Hume, A.N., L.M. Collinson, A. Rapak, A.Q. Gomes, C.R. Hopkins, and M.C. Seabra. 2001. Rab27a regulates the peripheral distribution of melanosomes in melanocytes. *J. Cell Biol.* 152:795–808.
- Hume, A.N., L.M. Collinson, C.R. Hopkins, M. Strom, D.C. Barral, G. Bossi, G.M. Griffiths, and M.C. Seabra. 2002. The leaden gene product is required with Rab27a to recruit myosin Va to melanosomes in melanocytes. *Traffic.* 3:193–202.
- Johannes, L., P.M. Lledo, M. Roa, J.D. Vincent, J.P. Henry, and F. Darchen. 1994. The GTPase Rab3a negatively controls calcium-dependent exocytosis in neuroendocrine cells. *EMBO J.* 13:2029–2037.
- Lang, T., I. Wacker, I. Wunderlich, A. Rohrbach, G. Giese, T. Soldati, and W. Almers. 2000. Role of actin cortex in the subplasmalemmal transport of secretory granules in PC-12 cells. *Biophys. J.* 78:2863–2877.
- Matesic, L.E., R. Yip, A.E. Reuss, D.A. Swing, T.N. O'Sullivan, C.F. Fletcher, N.G. Copeland, and N.A. Jenkins. 2001. Mutations in Mlph, encoding a member of the Rab effector family, cause the melanosome transport defects observed in leaden mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:10238–10243.
- Ménasché, G., E. Pastural, J. Feldmann, S. Certain, F. Ersoy, S. Dupuis, N. Wulfraat, D. Bianchi, A. Fischer, F. Le Deist, and G. de Saint Basile. 2000. Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat. Genet.* 25:173–176.
- Ménasché, G., J. Feldmann, A. Houdusse, C. Desaynard, A. Fischer, B. Goud, and G. de Saint Basile. 2003. Biochemical and functional characterization of Rab27a mutations occurring in Griscelli syndrome patients. *Blood.* 101:2736–2742.
- Nakata, T., and N. Hirokawa. 1992. Organization of cortical cytoskeleton of cultured chromaffin cells and involvement in secretion as revealed by quick-freeze, deep-etching, and double-label immunoelectron microscopy. *J. Neurosci.* 12:2186–2197.
- Oheim, M., and W. Stuhmer. 2000. Tracking chromaffin granules on their way through the actin cortex. *Eur. Biophys. J.* 29:67–89.
- Ornberg, R.L., L.T. Duong, and H.B. Pollard. 1986. Intragranular vesicles: new organelles in the secretory granules of adrenal chromaffin cells. *Cell Tissue Res.* 245:547–553.
- Provance, D.W., Jr., M. Wei, V. Ipe, and J.A. Mercer. 1996. Cultured melanocytes from dilute mutant mice exhibit dendritic morphology and altered melanosome distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:14554–14558.
- Raposo, G., M.J. Kleijmeer, G. Posthuma, J.W. Slot, and H.J. Geuze. 1997. Immunogold labeling of ultrathin cryosections: application in immunology. In *Handbook of Experimental Immunology*. 5th ed. Vol. 4. L.A. Herzenberg, D. Weir, C. Blackwell, editors. Blackwell Science, Cambridge, MA. 1–11.
- Rosé, S.D., T. Lejen, L. Casaletti, R.E. Larson, T.D. Pene, and J.M. Trifaro. 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., T. Salm, A. Rustom, and H.H. Gerdes. 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., T. Kogel, S.A. Kuznetsov, T. Salm, O. Schlicker, A. Hellwig, J.A. Hammer III, and H.H. Gerdes. 2003. Myosin Va facilitates the distribution of secretory granules in the F-actin rich cortex of PC12 cells. *J. Cell Sci.* 116:1339–1348.
- Sagné, C., C. Agulhon, P. Ravassard, M. Darmon, M. Hamon, S. El Mestikawy, B. Gasnier, and B. Giros. 2001. Identification and characterization of a lysosomal transporter for small neutral amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:7206–7211.
- Schlüter, O.M., M. Khvotchev, R. Jahn, and T.C. Sudhof. 2002. Localization versus function of Rab3 proteins. Evidence for a common regulatory role in controlling fusion. *J. Biol. Chem.* 277:40919–40929.
- Schonn, J.S., C. Desnos, J.P. Henry, and F. Darchen. 2003. Transmitter uptake and release in PC12 cells overexpressing plasma membrane monoamine transporters. *J. Neurochem.* 84:669–677.
- Slot, J.W., H.J. Geuze, S. Gigengack, G.E. Lienhard, and D. James. 1991. Immunolocalization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat. *J. Cell Biol.* 113:123–135.
- Sönnichsen, B., S. De Renzi, E. Nielsen, J. Rietdorf, and M. Zerial. 2000. Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J. Cell Biol.* 149:901–914.
- Spector, I., N.R. Shochet, Y. Kashman, and A. Groweiss. 1983. Latrunculin: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science.* 219:493–495.
- Steyer, J.A., and W. Almers. 1999. Tracking single secretory granules in live chromaffin cells by evanescent-field fluorescence microscopy. *Biophys. J.* 76:2262–2271.
- Stinchcombe, J.C., D.C. Barral, E.H. Mules, S. Booth, A.N. Hume, L.M. Machesky, M.C. Seabra, and G.M. Griffiths. 2001. Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes. *J. Cell Biol.* 152:825–834.
- Strobel, M.C., P.K. Seperack, N.G. Copeland, and N.A. Jenkins. 1990. Molecular analysis of two mouse dilute locus deletion mutations: spontaneous dilute lethal20J and radiation-induced dilute prenatal lethal Aa2 alleles. *Mol. Cell Biol.* 10:501–509.
- Strom, M., A.N. Hume, A.K. Tarafder, E. Barkagianni, and M.C. Seabra. 2002. A family of Rab27-binding proteins: melanophilin links Rab27a and myosin Va function in melanosome transport. *J. Biol. Chem.* 277:25423–25430.
- Trifaro, J., S.D. Rose, T. Lejen, and A. Elzagallaai. 2000. Two pathways control chromaffin cell cortical F-actin dynamics during exocytosis. *Biochimie.* 82:339–352.
- Wick, P.F., R.A. Senter, L.A. Parsels, M.D. Uhler, and R.W. Holz. 1993. Transient transfection studies of secretion in bovine chromaffin cells and PC12 cells. Generation of kainate-sensitive chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 268:10983–10989.
- Wightman, R.M., J.A. Jankowski, R.T. Kennedy, K.T. Kawagoe, T.J. Schroeder, D.J. Leszczyszyn, J.A. Near, E.J. Diliberto, Jr., and O.H. Viveros. 1991. Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:10754–10758.
- Wilson, S.M., R. Yip, D.A. Swing, T.N. O'Sullivan, Y. Zhang, E.K. Novak, R.T. Swank, L.B. Russell, N.G. Copeland, and N.A. Jenkins. 2000. A mutation in Rab27a causes the vesicle transport defects observed in ashen mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:7933–7938.
- Wu, X., B. Kocher, Q. Wei, and J.A. Hammer III. 1998. Myosin Va associates with microtubule-rich domains in both interphase and dividing cells. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 40:286–303.
- Wu, X., K. Rao, M.B. Bowers, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, and J.A. Hammer III. 2001. Rab27a enables myosin Va-dependent melanosome capture by recruiting the myosin to the organelle. *J. Cell Sci.* 114:1091–1100.
- Wu, X.S., K. Rao, H. Zhang, F. Wang, J.R. Sellers, L.E. Matesic, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, and J.A. Hammer III. 2002. Identification of an organelle receptor for myosin-Va. *Nat. Cell Biol.* 4:271–278.
- Yi, Z., H. Yokota, S. Torii, T. Aoki, M. Hosaka, S. Zhao, K. Takata, T. Takeuchi, and T. Izumi. 2002. The Rab27a/granuphilin complex regulates the exocytosis of insulin-containing dense-core granules. *Mol. Cell Biol.* 22:1858–1867.
- Zhao, S., S. Torii, H. Yokota-Hashimoto, T. Takeuchi, and T. Izumi. 2002. Involvement of Rab27b in the regulated secretion of pituitary hormones. *Endocrinology.* 143:1817–1824.

III.E.2.b. Résultats

Dans ce manuscrit, nous montrons que MyRIP et Rab27a sont exprimées dans les cellules PC12 et chromaffines. Les deux protéines colocalisent avec des marqueurs des GS, comme la chromogranine B ou le neuropeptide-Y. L'association de Rab27a à la surface des GS est également montrée par immuno-microscopie électronique. Les résultats issus de l'article publié dans *EMBO Reports* montraient une association de MyRIP et de Rab27 avec les mélanosomes, et plusieurs études montrent que des défauts de Rab27a sont associés avec des défauts du transport des mélanosomes (Wilson *et al.*, 2000; Hume *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2001; Hume *et al.*, 2002) et d'exocytose des granules lytiques des lymphocytes T cytotoxiques (Menasche *et al.*, 2000; Stinchcombe *et al.*, 2001).

Ici, nous montrons qu'un mutant de Rab27a dénué d'activité d'hydrolyse du GTP (Rab27aQ78L, constitutivement actif) inhibe la sécrétion régulée dans les cellules PC12 et chromaffines, de même que la surexpression de MyRIP dans ces mêmes cellules. Ces effets dépendent de l'état du cytosquelette d'actine, dans la mesure où ils sont modulés par des drogues qui modifient le degré de réticulation de celui-ci (jasplakinolide, latrunculine B). Enfin, nous démontrons par la technique de microscopie de fluorescence à onde évanescente que l'expression de Rab27aQ78L et la surexpression de MyRIP FL (forme entière, non tronquée) réduisent la mobilité des granules sécrétoires dans le réseau d'actine subcortical.

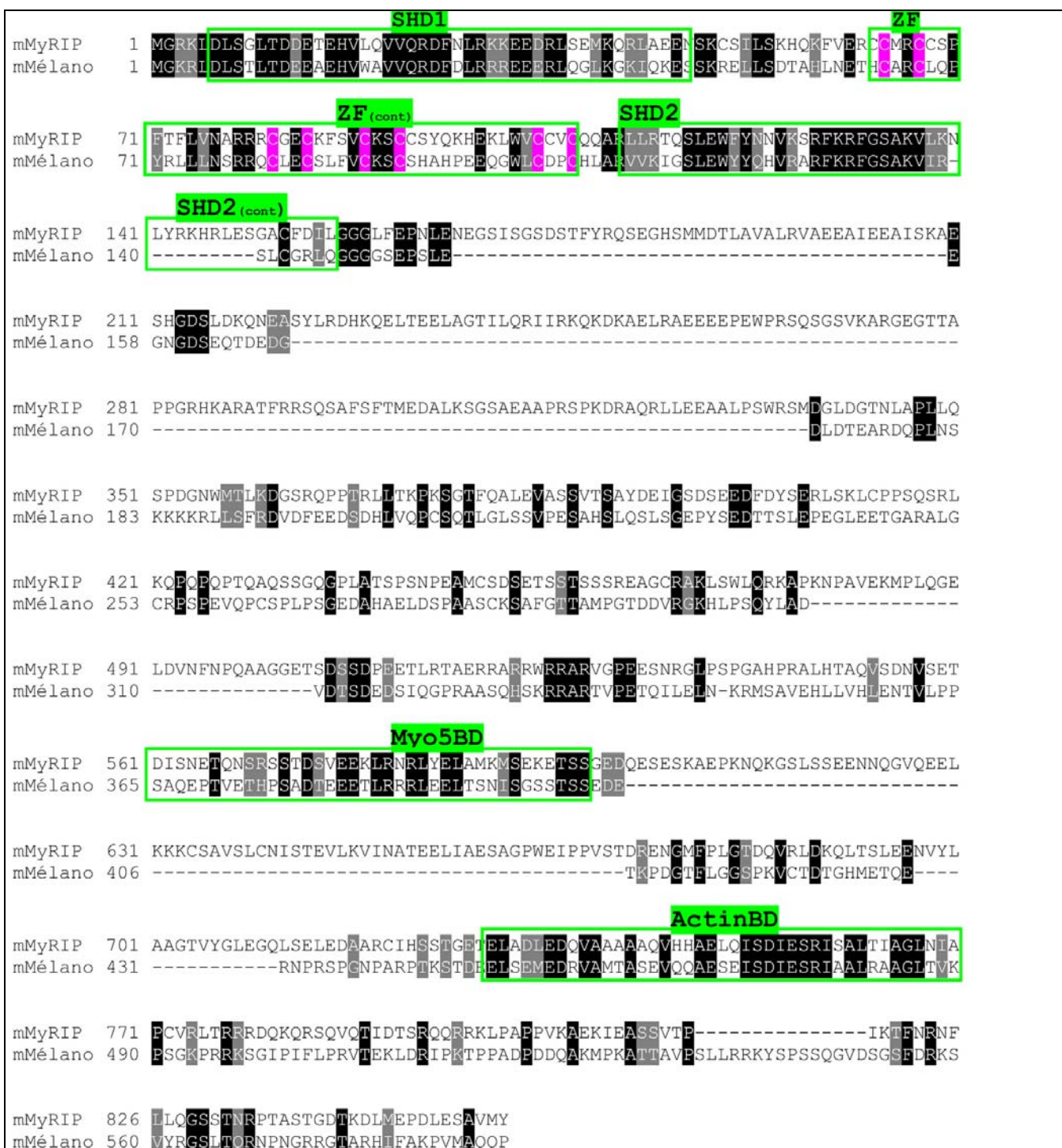


Figure 61

Alignement (Clustal W/BoxShade) de MyRIP (Slac2-c) et de la mélanophiline (Slac2-a) de souris (en surlignage noir, les aminoacides identiques; en gris, les aa similaires). Le domaine SHD2 comprend le motif SLEWF/YY, analogue au motif SGAWFF trouvé dans la rabphiline3a. Alors que Fukuda et coll. trouvent ce motif critique dans la liaison entre Rab27a et la mélanophiline (Fukuda *et al.*, 2002c), la mutation de ce motif en SLEAAA n'altère pas l'interaction MyRIP/Ra27a. Le motif SHD2 est séparé du motif SHD1 par un domaine en doigt à zinc (ZF), comprenant 8 cystéines (fond rose) conservées entre MyRIP et la mélanophiline, caractéristique également retrouvée dans Slp3-a et Slp4-a/granophiline-a (voir Figure 60). Le domaine minimal d'interaction entre la mélanophiline et la myosine-5a, déterminé par le groupe de Miguel Seabra (Strom *et al.*, 2002), comprend les acides aminés 367-400. Un motif proche est trouvée dans MyRIP (561-400). Un domaine putatif d'interaction entre la mélanophiline (et MyRIP) et l'actine peut être proposé sur l'observation de similarités dans les parties carboxyterminales de ces protéines.

III.E.2.c. Discussion

Nos données montrent que le rôle de Rab27a n'est pas limité à la régulation du transport des mélanosomes, mais que cette protéine joue également un rôle important dans le contrôle de la mobilité des GS dans les cellules neuroendocrines. MyRIP est aussi impliquée dans ce processus, vraisemblablement en fournissant un lien entre Rab27a et le cytosquelette d'actine. Le fait que Rab27a participe au contrôle de l'activité sécrétrice des cellules chromaffines et PC12 est en accord avec son rôle dans l'exocytose des granules cytotoxiques dans les lymphocytes T et les macrophages.

III.E.2.c.i. Liaison de MyRIP aux myosines et à l'actine

Dans les cellules neuroendocrines examinées, la liaison de MyRIP au cytosquelette sous-cortical d'actine peut se faire selon deux modes : directement, par le biais d'une région carboxyterminale, et indirectement par le biais de sa liaison à la myosine-5a, qui en retour se fixe à l'actine.

MyRIP ayant initialement été caractérisé comme un ligand des domaines MyTH4/FERM de la myosine-7a (El-Amraoui *et al.*, 2002), l'hypothèse la plus probable était que ce soit cette myosine qui assure le lien entre MyRIP et le cytosquelette d'actine. Cette myosine est en fait absente des cellules PC12 et chromaffines (nos observations), mais les domaines MyTH4/FERM sont également trouvés dans d'autres myosines, comme les myosines-7b, 10 et 15 (pour une revue sur les myosines non conventionnelles, voir Oliver *et al.*, 1999). Cependant, les profils d'expression connus de ces protéines (dans les cellules épithéliales, essentiellement) et les rares données disponibles (la myosine 10, par exemple, est concentrée dans les filopodes ; Berg *et al.*, 2002) semblent, *a priori*, écarter l'hypothèse d'un rôle de ces myosines dans le trafic des GS.

Nous avons déjà évoqué l'implication de la myosine-5a dans le transport des mélanosomes dans les mélanocytes de l'épiderme. Rappelons que des défauts de la myosine-5a sont à l'origine de défauts pigmentaires de l'épiderme, de rétinopathies et aussi de graves troubles neurologiques chez les patients atteints du Syndrome de Elejalde/Griscelli de type 1 (Pastural *et al.*, 1997), ainsi que chez les souris de la lignée *dilute* (Mercer *et al.*, 1991). Dans

la levure, myo2p est impliquée dans le trafic des vésicules post-Golgiennes vers la membrane plasmique et interagit avec Sec4 (Elkind *et al.*, 2000). On sait aussi que la myosine-5a est associée aux VS, peut-être via une interaction avec la synaptobrevine (Ohyama *et al.*, 2001).

Plusieurs groupes ont par ailleurs montré récemment l'expression de la myosine-5a dans les cellules chromaffines et son association aux GS (Rose *et al.*, 2003; Rudolf *et al.*, 2003). La surexpression de la queue de la myosine-5a dans les cellules PC12 ralentit le mouvement des granules immatures et provoque leur agrégation sous formes d'amas (Rudolf *et al.*, 2003).

Le groupe de Mikoshiba a récemment démontré une interaction de MyRIP avec la myosine-5a (Fukuda *et al.*, 2002b). Nous avons également cherché une interaction entre MyRIP et la myosine-5a. Cependant, la première construction testée (MyRIP 1-577), fusionnée à la GST, interagit bien avec la myosine-7a mais très faiblement avec la myosine-5a (non montré). Parallèlement, Strom et coll. ont également montré que la myosine-5a se liait au domaine 367-400 de la mélanophiline (Strom *et al.*, 2002), qui possède une certaine similarité de séquence avec la région 561-600 de MyRIP (voir Figure 61). Nous avons donc réalisé des constructions plus longues (MyRIP 1-665 ou 138-665), comprenant la région d'homologie entre la mélanophiline et MyRIP. Ces constructions lient à la fois la myosine-7a et la myosine-5a. On notera par ailleurs que la mélanophiline n'interagit pas avec la myosine-7a, et que la région 138-560 de MyRIP est très divergente dans la mélanophiline. Le domaine d'interaction de MyRIP avec la myosine-5a est donc sans doute compris entre les résidus 560 et 665. On voit donc qu'il n'existe pas de recouvrement exact des domaines de liaison de MyRIP aux myosines 5a et 7a.

Un autre mode de liaison de MyRIP à l'actine serait une liaison directe, par le biais de sa région carboxyterminale. Le groupe de Mikoshiba a démontré que la région carboxyterminale de la mélanophiline interagit avec l'actine; des expériences réalisées avec des protéines purifiées indiquent que cette association est directe (Fukuda *et al.*, 2002b). Ce même groupe a aussi montré, par des expériences de co-immunoprécipitation, que MyRIP pouvait lier l'actine. Cette étude ne démontre cependant pas que la liaison entre MyRIP et l'actine est directe. De plus, la région impliquée n'a pas été définie avec une grande précision (domaine 495-859, i.e. incluant le domaine de liaison à la myosine-5a). Nos propres données montrent que la région 666-859 de MyRIP est importante pour la liaison de MyRIP à l'actine (en co-

immunoprécipitation, figures 4A et 4B du manuscrit sous presse dans *The Journal of Cell Biology*), puisque sa délétion entraîne la perte de liaison détectable avec l'actine. De plus, cette forme tronquée de MyRIP (134-665) perd complètement sa co-localisation avec le cytosquelette sous-cortical d'actine (manuscrit *JCB*, figure 4C). On pouvait suspecter que cette liaison est en fait directe, puisque cette même délétion n'entraîne pas la perte d'interaction avec les myosines 5a et 7a. Des expériences préliminaires réalisées au laboratoire montrent qu'il existe une liaison directe du domaine 666-859 de MyRIP avec l'actine.

Les mêmes mutants (MyRIP 1-570 ou 1-665), ainsi que la forme MyRIP 1-134 (MyRIP-RBD) augmentent la mobilité des GS visualisés par microscopie à onde évanescente, contrairement à MyRIP 1-859 qui la réduit. Il est probable que la surexpression de la forme MyRIP-RBD interfère avec les complexes Rab27a/MyRIP endogènes (en titrant Rab27a endogène) et démasque ainsi leur fonction physiologique. Ces observations indiquent que la fonction de MyRIP endogène est bien de favoriser l'ancrage des GS au cytosquelette d'actine. De plus, l'augmentation de mobilité observée avec MRIP 1-665 (i.e. privé du domaine carboxyterminal) montre que c'est vraisemblablement la liaison directe de ce domaine à l'actine qui est responsable de l'immobilisation des GS, ce qui est confirmé par le fait que l'effet du mutant MyRIP 1-665 sur la sécrétion est insensible aux drogues affectant le cytosquelette d'actine.

Dans l'avenir, il sera bien sur intéressant de clarifier les rôles respectifs des deux modes de liaison de MyRIP à l'actine (dépendant et indépendant des myosines-5a/7a). On peut, par exemple, envisager que la liaison des GS aux microtubules assure le déplacement à longue distance puis que, dans un deuxième temps, la liaison directe de MyRIP à l'actine (via son domaine carboxyterminal) assure une rétention périphérique des GS au sein du cytosquelette d'actine. La dernière phase du processus pourrait impliquer le recrutement de myosines (myosine-5a, par exemple) pour assurer une mobilité des GS vers les sites d'exocytose. La recherche et l'étude de mutations ponctuelles dans les différents domaines (liaison aux myosines-5a et/ou 7a et/ou à l'actine) abolissant la liaison aux différents partenaires devrait permettre de clarifier la séquence et les modalités de ces interactions.

III.E.2.c.ii. Effet de Rab27a/MyRIP sur la sécrétion

Nos expériences indiquent que la surexpression de Rab27a sauvage et surtout du mutant Rab27aQ78L, i.e. la forme Rab27a:GTP, inhibe fortement la sécrétion des cellules PC12 et chromaffines bovines (mesurée par 3 méthodes différentes). De plus, ce mutant réduit la mobilité des GS à proximité immédiate de la membrane plasmique. Cependant, durant la préparation du manuscrit de cet article, le groupe d'Izumi a rapporté un effet facilitateur de Rab27a sauvage sur la sécrétion d'ACTH dans la lignée cellulaire AtT20 (Zhao *et al.*, 2002) et les cellules MIN6 (Yi *et al.*, 2002), tandis que parallèlement, Fukuda et coll. décrivaient un effet activateur sur la sécrétion de cellules PC12 (Fukuda *et al.*, 2002a). Cela n'est pas sans rappeler la situation observée dans le cas de Rab3, où des effets opposés sont vus, parfois au sein d'un même système expérimental. Ici aussi, le contexte cellulaire, i.e. les quantités des différents effecteurs de Rab27a doit jouer un rôle important. Il faut bien sur aussi prendre en compte la possibilité de biais dans les systèmes de mesure. Soulignons que dans notre propre étude, l'effet inhibiteur sur la sécrétion est observé avec 3 différentes techniques (test basé sur la sécrétion de [³H]5-HT, de hGH et mesures ampérométriques) sur différents types cellulaires (PC12 et cellules chromaffines bovines), ce qui limite la possibilité que cette observation soit purement artefactuelle. De plus, l'observation du ralentissement du mouvement des GS avec la microscopie par onde évanescente renforce ce point.

Nos observations indiquent donc que Rab27a et MyRIP permettent une association des GS au cytosquelette d'actine. Les effets de Rab27a et MyRIP sur la sécrétion dépendent, au moins partiellement, du degré de polymérisation de l'actine. Ces données semblent bien corrélées à l'effet de ces protéines sur la mobilité des GS à proximité de la membrane plasmique.

Ceci suggère que ces effets sur la sécrétion soient dus à un ancrage trop important des GS sur les filaments d'actine. On peut ainsi proposer que l'effet inhibiteur sur l'activité sécrétrice s'explique par une baisse de l'efficacité du recrutement, traduisant une réduction de la mobilité de GS vers la membrane plasmique, et donc un défaut de remplissage des pools libérables. On notera cependant que la forme tronquée MyRIP 1-665 inhibe, elle aussi la sécrétion. Son effet ne peut être attribué à cette explication, car ce mutant augmente la mobilité des GS. Cette observation ne contredit pas nécessairement l'hypothèse formulée plus haut pour le rôle de MyRIP (car ici l'effet du mutant MyRIP 1-665 semble indépendant de l'actine, car insensible à l'action de la latrunculine B ou de la jasplakinolide), mais pourrait

traduire le fait que MyRIP possède d'autres rôles, pour l'heure inconnus, dans le processus sécrétoire.

Le cytosquelette d'actine est considéré depuis de nombreuses années comme une barrière limitant l'accès des vésicules à la membrane plasmique (Aunis *et al.*, 1988; Trifaro *et al.*, 2000). Certains auteurs ont cependant proposé un rôle additionnel de l'actine qui pourrait guider le mouvement des VS (Lang *et al.*, 2000). Cependant, cette proposition n'a pas été formellement démontrée. Nos résultats représentent un progrès significatif dans l'étude de l'interaction VS/actine. Ils montrent que l'actine n'agit pas sur le mouvement des VS comme une barrière passive. Rab27a et MyRIP sont impliqués dans cette association et il sera intéressant de déterminer si cette association est le siège de régulations physiologiques. Le fait que MyRIP puisse lier l'actine directement ou par l'intermédiaire de moteurs moléculaires est aussi une observation intéressante, qui relance le débat sur le possible double rôle de l'actine (barrière/guide). Plus généralement, l'étape de transport des vésicules vers la membrane plasmique a été jusqu'ici relativement ignorée, au détriment des étapes plus tardives du processus. Nos données sur Rab27a et MyRIP indiquent cependant que cette étape de transport conditionne l'efficacité globale du processus de sécrétion. Ce travail a donc ouvert des perspectives intéressantes. Il faudra le poursuivre, en particulier en étudiant le rôle des myosines dans le trafic des VS et en mesurant l'effet du complexe Rab27/Myrip/myosine sur la mobilité des VS lors de la stimulation de l'activité sécrétrice.

Chapitre IV

Conclusions – Perspectives

IV. Conclusions – Perspectives

Lors de mon travail de thèse, j'ai abordé plusieurs aspects du cycle des granules de sécrétion : remplissage vésiculaire et régulation du quantum de sécrétion (projet SERT), mobilité des granules et interaction avec le cytosquelette (projet MyRIP & Rab27), phases plus tardives en amont du déclenchement de la fusion (projet Rab3).

IV.A. Projet SERT

Dans le premier projet présenté dans ce manuscrit (projet SERT), j'ai décrit la mise au point et la validation expérimentale d'une nouvelle technique permettant la mesure de l'activité sécrétrice d'une sous population de cellules PC12 exprimant SERT. Cette méthode permet la mesure de l'impact, sur le processus sécrétoire, d'une protéine donnée. Outre une stricte mise au point méthodologique, cette étude m'a poussé à aborder un certain nombre de points concernant la dynamique de la 5-HT au sein des cellules PC12 et la régulation du "quantum de sécrétion". On notera à ce propos que le terme de "quantum", consacré par l'usage historique, n'est en fait ici pas approprié, compte tenu de la grande dispersion des valeurs réelles du contenu vésiculaire. Nous avons confirmé l'existence d'une fuite granulaire, dissipant l'accumulation de 5-HT résultant de l'activité de VMAT (et donc indirectement de la V-ATPase). La présence de cette fuite, qui semble loin d'être négligeable quantitativement, empêche la concentration granulaire de 5-HT d'atteindre l'équilibre thermodynamique, tel qu'il serait décrit par les simples caractéristiques intrinsèques de VMAT et de la V-ATPase. Une implication de cette fuite est que la régulation du "quantum de sécrétion" n'est pas seulement gouvernée par des paramètres thermodynamiques, mais aussi par des critères cinétiques.

Concernant l'aspect méthodologique de notre étude, la mise au point du test de sécrétion après co-transfection de SERT nous a permis de nous affranchir du test de sécrétion de la GH, coûteux et fastidieux. Il semble que le test que nous avons mis au point puisse devenir assez populaire, d'autres laboratoires étudiant la sécrétion ayant commencé à l'utiliser. On notera que le principe de ce test peut se décliner, pour s'adapter aux caractéristiques des différents

sous-clones de PC12 existants. Il est par exemple envisageable d'employer la transfection de DAT ou de NET, dans le cas de clones possédant une activité endogène de transport de la 5-HT déjà importante.

Un autre avantage de cette technique est qu'elle permet de combiner, dans les mêmes cellules, une approche à l'échelle de la population (sécrétion de [³H]5-HT) et une approche de mesure unicellulaire de l'activité sécrétrice (détection ampérométrique de la 5-HT).

IV.B.Projet Rab3

Mes travaux sur Rab3 m'ont permis de montrer que Rab3:GTP a un effet sur le nombre de vésicules libérables. Nous pensons avoir amené des éléments convaincants suggérant que Rab3:GTP intervienne dans une étape précédant la constitution du pool libérable, mais sans pouvoir discriminer précisément les étapes impliquées, par exemple arrimage et amorçage. L'accent devra être mis, à l'avenir, sur une définition plus précise de l'étape (ou des étapes) d'implication de Rab3 dans le contrôle du processus sécrétoire. Voici quelques pistes que je souhaite pouvoir suivre pour continuer l'étude du mécanisme de Rab3.

Une question intéressante découle du problème pertinent soulevé par Schlüter et coll., même si nous ne sommes pas convaincus de la solidité de leurs observations concernant l'augmentation de la sécrétion basale par Rab3:GTP (Schluter *et al.*, 2002). Effectivement, un biais éventuellement important dans l'utilisation de systèmes expérimentaux faisant appel à la transfection (ou l'infection), est l'expression relativement lente de la protéine d'étude au sein du système et donc sa présence plusieurs heures ou jours avant la mesure expérimentale de la sécrétion, pouvant potentiellement introduire un biais expérimental.

Une voie intéressante, et à ma connaissance jusqu'ici non explorée dans le cas de Rab3, est la réalisation de formes mutantes dénuées d'affinité pour les nucléotides guaniliques (GDP/GTP) mais gagnant des propriétés de liaison des nucléotides xanthine di/tri-phosphate (XDP/XTP, des nucléotides naturels bien qu'aberrants, et présents à très faibles taux dans les cellules ; voir Jones *et al.*, 1995; Rybin *et al.*, 1996 pour des études appliquant cette stratégie à Ypt1 et Rab5, respectivement).

Ainsi, de telles formes mutantes de Rab3 (par exemple, un mutant liant le XTP mais incapable de l'hydrolyser) dans la cellule resteraient "neutres", jusqu'à la fourniture de XTP aux cellules qui permettrait de démasquer rapidement et spécifiquement leurs effets, sur une échelle de temps de quelques minutes. Ceci constitue ainsi un système inductible, non pas de la synthèse de la protéine, mais de sa "fonction". Le suivi de la sécrétion pourrait ensuite être réalisé par la technique ampérométrique, par exemple. Un point, peu documenté et qui reste à déterminer, est la stabilité dans la cellule de tels mutants en absence de XDP/XTP endogènes. S'il s'avère que ces mutants sont instables, il est envisageable de cultiver les cellules en présence de XDP/XTP, puis de fournir une forme non hydrolysable de XTP (XTP- γ S) au moment de l'expérience. Ceci permettrait d'affecter spécifiquement la population des molécules de Rab3 mutantes, sans toucher les autres protéines G de la cellule (qui sont affectées par l'emploi de GTP- γ S).

IV.B.1. Poursuite de la caractérisation du retard au déclenchement induit par Rab3a:GTP

On voit que nos résultats sur Rab3, obtenus par la combinaison de l'ampérométrie à fibre de carbone et de mesures sur populations par le biais du "test SERT", sont intéressants mais restent à approfondir. En particulier, un point informatif qui mérite d'être plus finement étudié est le retard au déclenchement de la sécrétion que nous avons observé, en ampérométrie, avec Rab3a:GTP.

D'un point de vue méthodologique, il semble nécessaire pour résoudre cette question de posséder un meilleur contrôle de la cinétique de stimulation des cellules, qui est difficilement maîtrisable avec le système de stimulation actuelle (dépolariation par application locale de solution à forte $[K^+]$). Il serait ainsi souhaitable de passer à un mode de stimulation beaucoup plus précis et reproductible, comme la dépolariation électrique en configuration de "patch-clamp", ou bien la stimulation de la sécrétion par libération homogène et instantanée de Ca^{2+} intracellulaire par une approche de photolyse de composés "cagés". L'option de stimulation électrique par la technique de patch-clamp permettrait également de mesurer les courants ioniques de la membrane plasmique, et de quantifier l'influx calcique. Il serait aussi possible, dans ce mode, de mesurer l'activité sécrétrice de la cellule par mesure de sa capacité membranaire. Cette approche présente plusieurs intérêts; d'une part, on peut mesurer

l'excitabilité de la cellule par Ca^{2+} , et donc contrôler que Rab3:GTP ne modifie pas cette excitabilité; d'autre part, on peut mesurer très finement la taille des différentes populations de GS impliquées : le pool de GS immédiatement libérable "rapide" (RRP), le pool de GS immédiatement libérable "lent" (SRP), ainsi que la vitesse de la phase lente qui reflète celle de la phase d'amorçage. On pourra donc ainsi déterminer si l'effet de Rab3 s'exerce sur l'amorçage ou le désamorçage. Cet outil apparaît donc comme une technique de choix pour compléter ce travail.

En collaboration avec Takeshi Shimara (Gif s/Yvette), j'avais entrepris une telle caractérisation, par mesure de capacité membranaire, de l'effet de l'expression, au sein de cellules chromaffines bovines, du mutant Rab3aQ81L. Malgré de nombreuses tentatives, ces essais sont restés infructueux. Un problème majeur que nous avons rencontré était une grande fragilité des cellules, du moins de leur membrane plasmique, qui semblait due au procédé de transfection choisi, l'électroporation. Le fait que l'électroporation fragilise la membrane plasmique, rendant les mesures de capacité membranaire difficiles (et le "patch" des cellules, de manière plus générale) m'a récemment été confirmé par Jakob Balslev Sørensen (du groupe de Erwin Neher, à Göttingen), qui a rencontré les mêmes problèmes. Il semble donc que cette technique de transfection soit à proscrire dans le cadre de mesures ultérieures de capacité membranaire, et c'est pourquoi ce groupe s'est orienté vers la piste de l'infection par le virus de Semliki (Ashery *et al.*, 1999; Duncan *et al.*, 1999).

Le laboratoire d'Erwin Neher possède des souris dont un ou plusieurs gènes de la famille Rab3 ont été inactivés. Leur caractérisation électrophysiologique pourrait être un aspect de mon travail post-doctoral, au sein de l'équipe dirigée par Jakob Balslev Sørensen. Une approche pourrait consister à générer des souris double mutants, par exemple dont les gènes codant les isoformes Rab3a et Rab3c (isoformes majoritaires dans les cellules chromaffines) sont inactivés, et à caractériser leur activité sécrétrice, puis à réintroduire des formes sauvages ou mutées de ces isoformes par infection virale, tout en mesurant les effets de ces réintroductions.

IV.B.2. Rab3 et les stocks intracellulaire de Ca²⁺

Un autre aspect du travail sur Rab3, entrepris à la toute fin de ma thèse, est l'implication de Rab3 dans la régulation de la mobilisation des réserves intracellulaires de Ca²⁺. Différents travaux, dont certains entrepris au laboratoire, en particulier en collaboration avec le groupe de Bernard Poulain (Strasbourg), ont montré un lien entre Rab3 et Ca²⁺. Concernant une connexion entre Rab3 et les stocks intracellulaires de Ca²⁺, peu de choses sont connues pour l'heure mais les travaux du groupe de Mayorga (voir III.D.5.a) ainsi que l'interaction de p150-Rab3GAP avec les récepteurs à l'IP3 du réticulum endoplasmique (R. Patterson et S. Snyder, Baltimore USA, communication personnelle) suggèrent qu'un lien fonctionnel intéressant puisse exister. Cette question importante devrait pouvoir être explorée dans un premier temps avec différentes drogues affectant le remplissage des différents stocks intracellulaires de Ca²⁺. En particulier, l'effet d'agents comme le NAADP (Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate), dont le mode d'action est encore mal connu mais pourrait impliquer les stocks granulaires/vésiculaires de Ca²⁺, serait à étudier (pour des revues sur les effets du NAADP, voir Genazzani *et al.*, 2002; Lee, 2003; Rutter, 2003).

On pourrait ainsi déterminer si Rab3 joue un rôle dans le contrôle des flux de calcium mettant en jeu des stocks intracellulaires ou si l'effet de Rab3 sur la sécrétion dépend de ces stocks calciques.

IV.B.3. Apport de la microscopie de fluorescence par onde évanescente

Nous avons vu dans le travail consacré à la caractérisation de Rab27 et MyRIP l'apport significatif de techniques comme la microscopie de fluorescence à onde évanescente. Celle-ci nous donne un accès direct à des informations précieuses concernant les quelques secondes précédant la fusion, auxquelles nous ne pouvons accéder par une approche électrochimique ou électrophysiologique. Nos données suggèrent fortement que Rab3 contrôle le maintien d'un compartiment vésiculaire arrimé et amorcé, prêt à répondre à l'influx calcique. Des informations extrêmement précieuses peuvent être amenées par l'utilisation de la microscopie par onde évanescente sur des cellules surexprimant divers mutants de Rab3; en particulier, cet outil devrait apporter des informations sur la constitution du pool de granules juxtamembranaires, et donc permettre l'étude de l'étape d'arrimage des GS à la membrane

plasmique. Il serait également possible d'observer la dynamique d'un tel pool en condition de stimulation, et d'étudier sa vitesse de reconstitution après une stimulation intense, entraînant une forte déplétion. En parallèle, l'étude des effecteurs connus de Rab3 doit se poursuivre, en utilisant le même type d'approche méthodologique.

IV.C.Projet Rab27 & MyRIP

Ce projet, qui est le fruit d'une collaboration réussie entre plusieurs laboratoires, nous a permis d'aborder ce sujet avec plusieurs techniques performantes, est sans conteste la partie la plus achevée et significative de mon travail. Dans cette étude, nous avons démontré que Rab27 et MRIP sont associés aux GS, permettent l'arrimage de ceux-ci au cytosquelette d'actine et contrôlent l'activité sécrétrice des cellules neuroendocrines. Un point particulièrement important du travail est l'implication de Rab27a/MyRIP dans le contrôle de la mobilité et/ou le recrutement des GS, ce qui confirme le rôle important de cette protéine Rab dans le contrôle de l'association d'organites avec le cytosquelette d'actine.

Cette question d'un rôle des protéines Rab dans l'association d'organites avec différents éléments du cytosquelette a connu des développements très importants durant les 5 dernières années. Jusqu'à récemment, peu d'exemples concernant l'implication de protéines Rab avec des éléments du cytosquelette, ou des moteurs moléculaires tels des kinésines ou dynéines, avaient été rapportés. Un des seuls exemples connus est la rabkinésine-6, une kinésine se liant à Rab6 et impliquée dans une étape de transport rétrograde entre l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique (Echard *et al.*, 1998). Rab7 a également été impliquée dans le contrôle du mouvement de lysosomes, par le biais du recrutement indirect de moteurs moléculaires (dynéines/dynactines), via son effecteur RILP (Jordens *et al.*, 2001). On voit ainsi qu'un des aspects importants de la fonction des Rab, et qui n'a été dévoilé que relativement récemment, est le recrutement de moteurs moléculaires sur des organites.

Quels développements pouvons-nous à présent apporter à ce travail ? On a vu qu'il était hautement probable que le domaine carboxyterminal de MyRIP lie directement l'actine. En effet, un mutant privé de ce domaine ne co-immunoprécipite plus l'actine de manière détectable, tout en gardant ses capacités de liaison aux myosines 5a et 7a. C'est également ce que suggèrent des expériences préliminaires d'interaction directe de MyRIP à l'actine. On sait

également que MyRIP peut connecter les GS au cytosquelette d'actine via la myosine-5a (et peut-être d'autres myosines).

IV.C.1. Les différents modes de liaison de MyRIP à l'actine

Un des axes d'étude poursuivis devra mettre l'accent sur les modalités et les fonctions de ces deux modes de liaison à l'actine. Il est possible que la liaison directe à l'actine permette une rétention périphérique des GS, et que la liaison aux myosines induise une mobilité des GS dans le cytosquelette sous-cortical d'actine. En effet, les travaux du groupe de Gerdes (Rudolf *et al.*, 2003), suggèrent que la myosine 5a favorise la dispersion des GS immatures au sein du cortex d'actine. Nous avons aussi observé qu'une myosine-5c tronquée provoquait l'agrégation de granules. Il nous semble donc intéressant de mesurer l'effet de ces myosines sur la mobilité des GS (par microscopie de fluorescence à onde évanescente), leur distribution intracellulaire, et sur l'activité sécrétrice des cellules.

Toujours dans l'optique de définir les fonctions physiologiques des différents modes d'interaction, il est possible d'utiliser une approche *in vitro*, telle que celle qui a été mise au point par le groupe d'Evelyne Coudrier (Institut Curie, Paris). Cette équipe a en effet réussi à visualiser le mouvement de mélanosomes le long de microfilaments purifiés, en présence de cytosol. Cette approche donne accès à la mesure du temps d'interaction vésicule/actine, de la longueur des trajectoires parcourues, et de la vitesse du mouvement. Surtout, ce système devrait permettre d'analyser les rôles respectifs de la liaison directe de Myrip à l'actine et de la myosine-5. Les granules et le cytosol seront extraits de cellules contrôles ou de cellules exprimant différents mutants de Rab27a/Myrip/myosine-5. De plus, dans cet environnement simplifié, des peptides, des protéines purifiées ou des anticorps peuvent être facilement mis au contact des membranes pour mesurer leur effet sur l'interaction membrane/actine ou sur le mouvement.

IV.C.2. Interaction vésicules synaptiques/actine

Le travail effectué sur Rab27a et Myrip concerne les cellules neuroendocrines. Nous avons cependant observé que Myrip est exprimé aussi dans le cerveau, contrairement à Rab27a. Dans la rétine, Myrip serait associé aux synapses à ruban. Il serait donc intéressant d'analyser le rôle éventuel de Myrip dans le trafic des VS ou d'autres organites plus proches des mélanosomes comme les lysosomes. L'isoforme Rab27b qui est détectable dans le

système nerveux (Zhao *et al.*, 2002) pourrait participer à l'association membranaire de Myrip dans ces cellules. Une raison supplémentaire de s'intéresser au rôle de Rab27/Myrip dans le trafic des VS est le fait que la myosine-5a est associée à ces organites.

En définitive, nos travaux sur Rab3 et Rab27 illustrent bien la diversité et l'importance des mécanismes d'action des protéines Rab. On voit ainsi au travers de ces études que les protéines Rab régulent de nombreux aspects du cycle des organites intracellulaires, et sont ainsi des protéines régulatrices clés dans ce trafic.

Chapitre V

Matériels et Méthodes

V. Matériels et méthodes

V.A. Biologie Cellulaire

Tous les produits de cultures sont obtenus auprès de Invitrogen/Life Technologies (Groningen, Pays-Bas), sauf mention contraire.

V.A.1. Cellules chromaffines de la médullosurrénale

V.A.1.a. Préparation des cellules chromaffines de la médullo-surrénale bovine.

Les cellules sont préparées selon le protocole décrit par Livett (Livett, 1984), avec quelques modifications. Les glandes surrénales bovines (généralement 4 à 6, permettant de récupérer ~50 millions de cellules/glande), collectées immédiatement après le sacrifice des animaux et conservées au froid durant le transport, sont injectées par la veine principale avec une solution de Locke froid (NaCl 154 mM, KCl 5,6 mM, NaHCO₃ 3,4 mM, glucose 5,6 mM, Hepes 15 mM, pH 7.4) afin d'éviter la coagulation du sang dans l'organe. Les glandes sont dégraissées et rétro-perfusées avec une solution de collagénase (1g/l) et de BSA (5g/l) dans du Locke (5 ml/min., 37°C, 1h). La collagénase dissocie efficacement les cellules de la médullo-surrénale, mais peu les cellules du cortex. Les glandes sont ensuite ouvertes, la médullo-surrénale prélevée et finement hachée dans du Locke ; le broyat est passé successivement au travers de membranes (Nylon) de 200 et 100 µm de taille de pore. À ce stade, les agrégats cellulaires sont majoritairement dissociés.

Afin de séparer les cellules chromaffines des autres types cellulaires présents (cellules du cortex, fibroblastes, hématies) et des débris cellulaires, les cellules sont séparées sur gradient autogénéré de Percoll (pH 7,4, 20.000 g, 20 min., température ambiante). La fraction intermédiaire (entre surnageant - débris et cellules corticales - et culot d'hématies), enrichie en cellules chromaffines, est collectée et centrifugée afin d'éliminer le Percoll (~100 g, 10 min.).

Les cellules sont délicatement reprises dans du Locke, centrifugées et finalement reprises dans du milieu complet : (DMEM/F12 (1/1, v/v), sérum foetal de veau 10%, fluoro-déoxy-uridine 10 mM, cytosine-arabinoside 1 mM, pénicilline 100 U/ml, streptomycine 100 µg/ml. La présence d'antimitotiques (fluoro-déoxy-uridine et cytosine-arabinoside) durant les premières 24 heures de culture vise à éliminer sélectivement les cellules contaminantes. Les cellules chromaffines, quiescentes, ne sont pas affectées par la présence de ces drogues. Leur emploi à long terme pouvant néanmoins avoir des effets délétères, elles sont supprimées le second jour de culture, ou bien leur concentration est réduite (1/10).

Les cellules sont comptées en présence d'un colorant vital (bleu trypan 0,1%), puis amenées à la concentration désirée (~1 million/ml) par dilution dans du milieu complet. À ce stade, des cellules contaminantes (fibroblastes) sont encore présentes. Pour certaines expérimentations, les cellules chromaffines sont purifiées (>90%) sur le principe des différences d'adhérence des cellules au plastique nu. Les cellules sont mises en culture (500.000/cm²) pendant un temps court (6 à 12 h), et les cellules faiblement adhérentes (chromaffines) sont récoltées. Les fibroblastes sont plus adhérents au plastique que les chromaffines et ne sont donc pas prélevés. La suspension cellulaire est centrifugée (~100 g, 10 min.), et les cellules sont reprises dans du milieu complet, comptées en présence de bleu trypan et mises en boîtes de culture (~100.000/cm²) à fond recouvert de poly-lysine (5 µg/cm²) ou de collagène (type VII, 5µg/cm²).

V.A.1.b. Transfection par électroporation

Immédiatement après la préparation, la quantité requise de cellules (~1,5 million par condition) est collectée par centrifugation (~100 g, 10 min.), puis resuspendue dans le tampon A du kit de transfection Optimix (Equibio, Angleterre). Des volumes correspondants à une transfection individuelle (~1,5 million) sont centrifugés séparément (~100 g, 10 min.) dans des tubes de type Eppendorf. Les culots sont délicatement repris dans 110 µl du tampon B du kit Optimix, contenant les ADN à transférer (usuellement 6 µg d'ADN d'intérêt et 1µg de plasmide codant le gène rapporteur). Les compositions des solutions A et B du kit Optimix ne sont pas connues, mais nous savons que la solution B contient de l'ATP et du glutathion, ce dernier étant probablement important pour protéger les cellules des radicaux libres produits lors de l'électroporation.

Les agrégats cellulaires sont dissociés par 3 passages successifs au travers d'une aiguille fine (\varnothing 0,4 mm), et la goutte est déposée dans le fond d'une boîte de culture (\varnothing 35 mm), entre les plaques de l'électrode d'électroporation (d=5 mm). Les cellules sont soumises à un choc électrique ($875 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$, 1x24 ms, générateur Jouan GHT-1287) puis immédiatement reprises dans 2 ml de milieu préchauffé (37°C), et réparties dans des boîtes ou des puits de culture, à une densité d'environ 100.000 cellules/cm². Le milieu est changé 24h après la transfection, et les cellules sont utilisées de 2 à 6 jours plus tard.

V.A.2. Cellules PC12

V.A.2.a. Conditions de culture

Les cellules PC12 (sous clone P38, don de G. Ahnert-Hilger, Berlin, Allemagne) sont cultivées dans des flacons recouverts de collagène (type VII, $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, Sigma), à une densité de $200 \cdot 10^3$ à $400 \cdot 10^3$ cellules/cm², à 37°C dans une atmosphère à 5 % de CO₂. Le milieu de culture utilisé est du DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, glucose 1 g/L), supplémenté avec 5 % de sérum de veau foetal inactivé, 10% sérum de cheval inactivé en présence d'antibiotiques (gentamicine 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et/ou streptomycine 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pénicilline 50 U/ml). Les flacons (75 cm²) sontensemencés par ~5 millions de cellules. Les cellules subconfluentes (25-30 millions/75 cm²) sont passées une fois par semaine. Le milieu de culture est aspiré, et les cellules rincées 2 fois avec une solution de PBS. Les cellules sont décollées par un court traitement à la trypsine (2 minutes, trypsine 0,5 mg/ml, EDTA 0,2 mg/ml, dans la solution saline de Puck modifiée). L'action de la trypsine est ensuite ralentie par adjonction de 15 ml de milieu de culture complet. Les cellules sont comptées avec un hématimètre de Malassez, puis réensemencées à la densité désirée. Pour les expérimentations de sécrétion sur population (sécrétion de [³H]5-HT après transfection par SERT), les cellules sontensemencées à $2 \cdot 10^5$ cellules/cm² ; pour les enregistrements ultérieurs par méthode ampérométrique, environ $5 \cdot 10^4$ cellules/cm².

V.A.2.b. Transfection par lipofection

Douze à 24 heures avant la transfection, les cellules sont collectées et déposées dans des puits de culture (voir ci-dessus). Les cellules sont transfectées par lipofection (DMRIE-C,

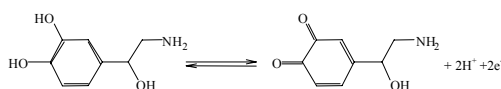
Invitrogen) selon le protocole recommandé par le fournisseur, avec les modifications suivantes : pour un puits de culture de 2 cm², 1,25 µL de solution lipofectante sont employés, avec 0,8 µg d'ADN total. Le mélange lipofectant/ADN (300µL/puits), réalisé dans du milieu de culture sans sérum, est laissé au contact des cellules pour 3 à 5 heures. Le mélange est ensuite aspiré, et remplacé par 500 µL de milieu complet (avec sérum). Les cellules sont utilisées usuellement 4 jours après la transfection. Cette méthode donne une efficacité de transfection comprise entre 10 et 30% (estimée par expression de la EGFP).

V.B. Détection ampérométrique des catécholamines par ampérométrie à fibre de carbone

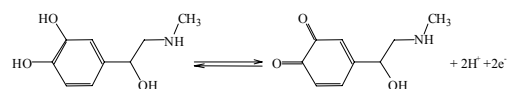
V.B.1. Principe

Les techniques électrochimiques ont été utilisées depuis bientôt 25 ans pour étudier les concentrations de neurotransmetteurs dans le cerveau, mais leur emploi pour la mesure de la libération de substances oxydables au niveau unicellulaire ne date que du début des années 90.

Les cellules chromaffines de la médullo-surrénale sont les premières cellules sur lesquelles fut étudiée la sécrétion par détection électrochimique des catécholamines par ampérométrie à fibre de carbone (AFC) ; la sécrétion dans ce modèle présente en effet des caractéristiques de choix pour une étude par cette technique : les granules de sécrétion (jusqu'à 400 nm de Ø) contiennent à forte concentration (~ 700 mM) des substances aisément oxydables (adrénaline, noradrénaline). Ainsi, le nombre de molécules libérées par un événement unique est élevé, 3 millions en moyenne, à comparer avec le nombre de molécules d'acétylcholine libéré par une vésicule synaptique dans une jonction neuromusculaire classique (~500 à 20.000). Le courant d'oxydation est donc important, tout à fait détectable par un appareillage sensible.



(noradrénaline)



(adrénaline)

Cette technique présente de nombreux avantages par rapport à d'autres méthodes d'investigation de la sécrétion en temps réel, comme le patch-clamp avec mesure de capacitance membranaire, qui, historiquement, a précédé l'AFC. Premièrement, contrairement à la mesure de capacitance, l'AFC ne nécessite pas de voltage-clamp de la cellule ; c'est donc une méthode non invasive, et qui ne présente pas le défaut de dialyse du cytosol par la pipette de patch. Ensuite, cette méthode permet la visualisation directe du nombre de molécules oxydées, ce qui n'est pas le cas de mesure de capacitance, qui, d'une part, est dépendante d'un modèle physique (capacité membranaire), et, d'autre part, fait la sommation des événements d'exocytose et d'endocytose. Enfin, sa sensibilité est encore plus grande que celle de la mesure de capacitance, et des événements impliquant moins de 20.000 molécules ont pu être détectés (Chen *et al.*, 1994).

V.B.2. Fabrication des ultra-microélectrodes

Les électrodes à fibre de carbone sont réalisées selon la méthode mise au point par S. Arbault (E.N.S Paris, Département de Chimie), et décrite dans son mémoire de thèse. Brièvement, une fibre de carbone (\varnothing 8-10 μm , Amocco, don de Stéphane Arbault) est aspirée dans un tube capillaire (GC 120F-10, \varnothing 1,2 mm(ext.)/0.69mm(int.), Harvard Apparatus Ltd., Edendbridge, Angleterre), puis le capillaire est étiré avec une microétireuse (PB-7, Narishige, Tokyo, Japon). Les deux électrodes résultantes sont séparées par coupure de la fibre de carbone, qui reste inaltérée par l'étirage. La forme de l'électrode et la qualité du scellement verre/carbone sont vérifiées à la loupe binoculaire.

La fibre de carbone est ensuite isolée sur la totalité de sa surface par électrodéposition d'un film de résine isolante. Les électrodes, dont les capillaires sont remplis de mercure afin d'assurer le contact électrique entre le carbone et un fil connecteur, sont trempées dans une solution, préparée extemporanément dans un mélange équimolaire eau/éthanol, contenant : 2-allylphénol (monomère, 230 mM), allylamine (co-monomère, 400 mM), 2-butoxyéthanol (230 mM).

La réaction de polymérisation radicalaire est initiée par l'application d'une tension (+4V) entre l'électrode (anode) et une cathode de platine. Le film isolant (poly-oxyphénylène, 1-2 μm) est formé en 3 minutes environ. L'électrode est rincée à l'eau et inspectée sous loupe binoculaire. Le film isolant est détecté par la présence de petites irrégularités du dépôt (perles). Le polymère est ensuite réticulé par passage à l'étuve (3h, 150°C). L'électrode,

isolée à présent sur toute sa surface, est coupée au scalpel à environ 1 cm du contact verre/carbone. Afin de donner à la surface électroactive une géométrie définie et reproductible, l'extrémité de celle-ci est polie sous un angle de 45° avec une polisseuse à disque diamanté (EG-4, Narishige, Tokyo, Japon). Seule la surface polie est conductrice, ce qui augmente le rapport signal/bruit.

Les capacités électroréactives des électrodes sont testées avant l'usage. Le signal d'oxydation dans une solution fraîche de dopamine (10 µM) dans l'eau doit être stable, et constant quelque soit la profondeur d'enfoncement de l'électrode dans la solution (le cas inverse révélant une isolation discontinue sur la longueur de l'électrode). L'amplitude de réponse dans une telle solution doit être trouvée proche de 28 pA pour une électrode de 10 µm de diamètre, taillée en biseau à 45°.

V.B.3. Enregistrement de la libération de catécholamines.

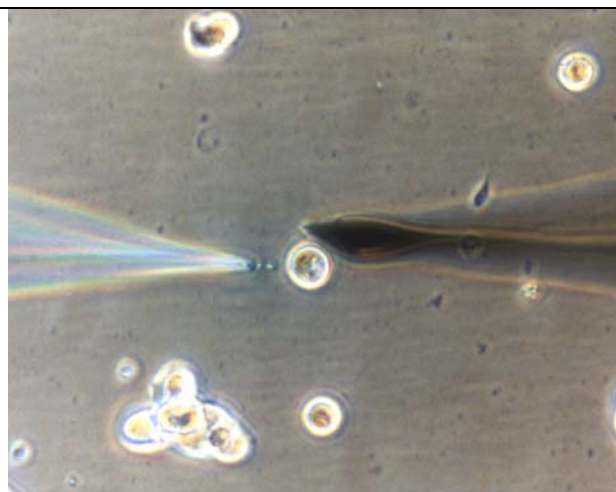
V.B.3.a. Stimulation des cellules

Les cellules (PC12 ou cellules chromaffines) sont transférées dans du Locke supplémenté en Ca²⁺ et Mg²⁺ juste avant les mesures (Locke, CaCl₂ 2,5 mM, MgCl₂ 1,2 mM) et positionnées sur la platine d'un microscope inversé à contraste de phase (Diaphot TMD, Nikon, Tokyo, Japon). Juste avant la stimulation, l'électrode à fibre de carbone est approchée de la cellule grâce à un micromanipulateur (MO-203, Narishige, Tokyo, Japon) et délicatement poussée contre la membrane plasmique de la cellule, puis éloignée à une faible distance (<1 µm ; voir Figure 62).

Le dispositif de stimulation est constitué d'un capillaire en borosilicate (GC 150F-15, Ø 1,5 mm(ext.)/0.86mm(int.), Harvard Apparatus Ltd., Edendbridge, Angleterre) étiré à l'aide d'une microétireuse (Sachs Flaming, PC-84). Les pipettes résultantes ont une ouverture proche du µm. Les cellules sont stimulées par la libération d'une bouffée (5-10 sec.) de solution stimulante (Locke à 55 mM K⁺, ou 40 µM de nicotine dans du Locke ordinaire), à environ 10-20 µm de la cellule (pipette positionnée grâce à un micromanipulateur motorisé 5171, Eppendorf, Hambourg, Allemagne). La pression appliquée (500-2000 hPa), délivrée par un nano-injecteur (5246, Eppendorf, Hambourg, Allemagne), est ajustée afin d'avoir un nuage stimulant à peu près constant. Ceci est permis par la visualisation du nuage, coloré par du Fast Green (1 mg/ml).

Figure 62

Une cellule chromaffine bovine est prête à être enregistrée. L'électrode de carbone (\varnothing 8 ou 10 μM , à droite) est délicatement positionnée contre la membrane plasmique de la cellule. La pipette de stimulation, consistant en un microcapillaire étiré (à gauche) contenant la solution stimulante (55 mM K^+ ou 40 μM nicotine, additionnée de Fast Green 0,5 mg/ml) est approchée à ~ 10 μM de la cellule pour minimiser la dilution de la solution stimulante dans la solution de bain.



V.B.3.b. Acquisition des traces

La mesure ampérométrique est réalisée avec un potentiostat AMU-130 (Radiometer Analytical, Copenhague, Danemark), à potentiel constant de 750 mV appliqué entre l'électrode de carbone et une contre-électrode de référence en argent chlorulé (Ag/AgCl). Le temps de réponse de ce potentiostat a été modifié pour atteindre 50 μs . La sortie analogique est digitalisée à 1 kHz (Computer Boards, DAS 1000), et acquise grâce au logiciel Elphy (Gérard Sadoc, Gif sur Yvette).

Une tension constante de + 700 mV, suffisante pour l'oxydation des catécholamines, est appliquée entre l'électrode à fibre de carbone et une contre-électrode d'argent chlorulé (Ag/AgCl, voir figure n°3). Les électrons résultants sont captés par l'électrode à fibre de carbone, et le courant généré est détecté et mesuré par un nano-ampèremètre (AMU-130, Radiometer Analytical, Copenhague). Ce dernier renvoie en signal de sortie une différence de potentiel proportionnelle au courant mesuré, qui est acquise et digitalisée à 1 kHz par l'interface MacLab 2e (ADInstruments). Les traces sont visualisées et analysées grâce au logiciel Chart (v3.61, ADInstruments).

Toutes les expérimentations sont conduites en alternant cellules transfectées et cellules contrôles non transfectées présentes dans la même boîte (contrôle interne) pour limiter un biais éventuel dû à un encrassement de l'électrode (par des débris cellulaires, par exemple). Notre expérience montre que, dans le cas d'enregistrement de cellules chromaffines électroporées notamment, l'état de surface de l'électrode se dégrade progressivement au cours

des enregistrements. La surface électroactive de l'électrode est ainsi nettoyée par bref polissage au maximum après 5 cellules enregistrées, ou dès qu'un signe manifeste de défaut de détection est apparent (absence de réponse de cellules contrôle, ou absence de déflexion par oxydation du Fast Green présent dans la solution de stimulation).

V.C. Mesure de la sécrétion de [³H]5-HT sur population de cellules PC12

Les détails de la technique sont discutés dans la partie consacrée au rôle des transporteurs plasmiques de monoamines dans la régulation de la taille quantique. Brièvement : le jour de l'expérimentation, le milieu des puits de culture est remplacé par 600 µL de milieu complet (avec sérum) contenant 100 nM de [³H]5-HT (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Angleterre, 5-20 Ci/mmol). Après 1h à 27°C, les cellules sont lavées avec 500 µL de solution de Locke plus 0,2% BSA, et remises à 37°C pendant 1h30 dans du milieu de culture ordinaire (avec sérum). Les cellules sont ensuite à nouveau rincées (2 x 10 min dans du Locke additionné de BSA 0,2%). La sécrétion est stimulée par 500 µl de Locke modifié (55 mM K⁺, avec Na⁺ réduit à 104,5 mM) ; les conditions non stimulées sont réalisées en présence de solution de Locke standard (5,5 mM K⁺, 154 mM Na⁺). Après 2 à 10 minutes d'incubation (32-34°C), le milieu est collecté, et les cellules reprises dans 0,5 ml d'une solution détergente de Triton X-100 (1%) additionnée d'EDTA (1 mM). La radioactivité présente dans le surnageant et les cellules est déterminée par comptage par scintillation.

Pour les expérimentations sur cellules perméabilisées, les cellules sont rincées (2 x 10 min) dans du Locke sans calcium additionné d'EGTA (2 mM), puis perméabilisées (4 min, 32-34°C) en présence de digitonine (20 µM) ou de streptolysine-O (22U/ml) dans un milieu contenant (en mM) : glutamate de potassium 139, PIPES 20, HEDTA 2, EGTA 2, Mg²⁺ libre 1, ATP 2, et 0,3% BSA. Le pH est ajusté à 7 avec de la potasse. La sécrétion est stimulée dans le même milieu, additionné de Ca²⁺ (0,1 à 100 µM de Ca²⁺ libre ; les concentrations de Ca²⁺ libre sont calculées avec le logiciel Calcv22 (Fohr *et al.*, 1993) et/ou le logiciel MaxChelator (Bers *et al.*, 1994) <http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html>).

Chapitre VI

Bibliographie

VI. Bibliographie

- Abu-Amer, Y., Teitelbaum, S. L., Chappel, J. C., Schlesinger, P. et Ross, F. P. J Bone Miner Res (1999). **14**(11): 1855-60. Expression and regulation of RAB3 proteins in osteoclasts and their precursors
- Adachi, R., Nigam, R., Tuvim, M. J., DeMayo, F. et Dickey, B. F. Biochem Biophys Res Commun (2000). **273**(3): 877-83. Genomic organization, chromosomal localization, and expression of the murine RAB3D gene
- Adler, E. M., Augustine, G. J., Duffy, S. N. et Charlton, M. P. J Neurosci (1991). **11**(6): 1496-507. Alien intracellular calcium chelators attenuate neurotransmitter release at the squid giant synapse
- Albillos, A., Dernick, G., Horstmann, H., Almers, W., Alvarez de Toledo, G. et Lindau, M. Nature (1997). **389**(6650): 509-12. The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry
- Albillos, A., Neher, E. et Moser, T. J Neurosci (2000). **20**(22): 8323-30. R-Type Ca²⁺ channels are coupled to the rapid component of secretion in mouse adrenal slice chromaffin cells
- Alexandrov, K., Horiuchi, H., Steele-Mortimer, O., Seabra, M. C. et Zerial, M. Embo J (1994). **13**(22): 5262-73. Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated rab proteins to their target membranes
- Al-Matubsi, H. Y., Breed, W., Jenkin, G. et Fairclough, R. J. Anat Rec (1999). **254**(2): 214-21. Co-localization of Rab3B and oxytocin to electron dense granules of the sheep corpus luteum during the estrous cycle
- Almers, W. Nature (2001). **409**(6820): 567-8. Fusion needs more than SNAREs
- Amatore, C., Bouret, Y., Travis, E. R. et Wightman, R. M. Biochimie (2000). **82**(5): 481-96. Interplay between membrane dynamics, diffusion and swelling pressure governs individual vesicular exocytotic events during release of adrenaline by chromaffin cells
- Anderson, G. M. et Horne, W. C. Biochim Biophys Acta (1992). **1137**(3): 331-7. Activators of protein kinase C decrease serotonin transport in human platelets
- Anikster, Y., Huizing, M., Anderson, P. D., Fitzpatrick, D. L., Klar, A., Gross-Kieselstein, E., Berkun, Y., Shazberg, G., Gahl, W. A. et Hurvitz, H. Am J Hum Genet (2002). **71**(2): 407-14. Evidence that Griscelli syndrome with neurological involvement is caused by mutations in RAB27A, not MYO5A
- Araki, K., Horikawa, T., Chakraborty, A. K., Nakagawa, K., Itoh, H., Oka, M., Funasaka, Y., Pawelek, J. et Ichihashi, M. Pigment Cell Res (2000). **13**(5): 332-6. Small Gtpase rab3A is associated with melanosomes in melanoma cells
- Arribas, M., Regazzi, R., Garcia, E., Wollheim, C. B. et De Camilli, P. Eur J Cell Biol (1997). **74**(3): 209-16. The stimulatory effect of rabphilin 3a on regulated exocytosis from insulin-secreting cells does not require an association-dissociation cycle with membranes mediated by Rab 3
- Artalejo, C. R., Adams, M. E. et Fox, A. P. Nature (1994). **367**(6458): 72-6. Three types of Ca²⁺ channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells
- Ashery, U., Betz, A., Xu, T., Brose, N. et Rettig, J. Eur J Cell Biol (1999). **78**(8): 525-32. An efficient method for infection of adrenal chromaffin cells using the Semliki Forest virus gene expression system
- Ashton, A. C., Rahman, M. A., Volynski, K. E., Manser, C., Orlova, E. V., Matsushita, H., Davletov, B. A., van Heel, M., Grishin, E. V. et Ushkaryov, Y. A. Biochimie (2000). **82**(5): 453-68. Tetramerisation of alpha-latrotoxin by divalent cations is responsible for toxin-induced non-vesicular release and contributes to the Ca(2+)- dependent vesicular exocytosis from synaptosomes
- Ashton, A. C., Volynski, K. E., Lelianova, V. G., Orlova, E. V., Van Renterghem, C., Canepari, M., Seagar, M. et Ushkaryov, Y. A. J Biol Chem (2001). **276**(48): 44695-703. alpha-Latrotoxin, acting via two Ca²⁺-dependent pathways, triggers exocytosis of two pools of synaptic vesicles
- Augustine, G. J. Curr Opin Neurobiol (2001). **11**(3): 320-6. How does calcium trigger neurotransmitter release?
- Aunis, D. et Bader, M. F. J Exp Biol (1988). **139**: 253-66. The cytoskeleton as a barrier to exocytosis in secretory cells

- Baldini, G., Hohl, T., Lin, H. Y. et Lodish, H. F. Proc Natl Acad Sci U S A (1992). **89**(11): 5049-52. Cloning of a Rab3 isotype predominantly expressed in adipocytes
- Baldini, G., Wang, G., Weber, M., Zweyer, M., Bareggi, R., Witkin, J. W. et Martelli, A. M. J Cell Biol (1998). **140**(2): 305-13. Expression of Rab3D N135I inhibits regulated secretion of ACTH in AtT- 20 cells
- Banerjee, A., Barry, V. A., DasGupta, B. R. et Martin, T. F. J Biol Chem (1996). **271**(34): 20223-6. N-Ethylmaleimide-sensitive factor acts at a prefusion ATP-dependent step in Ca²⁺-activated exocytosis
- Bauman, A. L., Apparsundaram, S., Ramamoorthy, S., Wadzinski, B. E., Vaughan, R. A. et Blakely, R. D. J Neurosci (2000). **20**(20): 7571-8. Cocaine and antidepressant-sensitive biogenic amine transporters exist in regulated complexes with protein phosphatase 2A
- Bennett, M. K., Calakos, N. et Scheller, R. H. Science (1992). **257**(5067): 255-9. Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones
- Berg, J. S. et Cheney, R. E. Nat Cell Biol (2002). **4**(3): 246-50. Myosin-X is an unconventional myosin that undergoes intrafilopodial motility
- Bers, D. M., Patton, C. W. et Nuccitelli, R. Methods Cell Biol (1994). **40**: 3-29. A practical guide to the preparation of Ca²⁺ buffers
- Betz, A., Thakur, P., Junge, H. J., Ashery, U., Rhee, J. S., Scheuss, V., Rosenmund, C., Rettig, J. et Brose, N. Neuron (2001). **30**(1): 183-96. Functional interaction of the active zone proteins Munc13-1 and RIM1 in synaptic vesicle priming
- Block, M. R., Glick, B. S., Wilcox, C. A., Wieland, F. T. et Rothman, J. E. Proc Natl Acad Sci U S A (1988). **85**(21): 7852-6. Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport
- Bloom, O., Evergren, E., Tomilin, N., Kjaerulff, O., Low, P., Brodin, L., Pieribone, V. A., Greengard, P. et Shupliakov, O. J Cell Biol (2003). **161**(4): 737-47. Colocalization of synapsin and actin during synaptic vesicle recycling
- Bock, J. B., Matern, H. T., Peden, A. A. et Scheller, R. H. Nature (2001). **409**(6822): 839-41. A genomic perspective on membrane compartment organization
- Borst, J. G. et Sakmann, B. Nature (1996). **383**(6599): 431-4. Calcium influx and transmitter release in a fast CNS synapse
- Brachvogel, V., Neu, M. et Metcalf, P. Proteins (1997). **27**(2): 210-2. Rab7: crystallization of intact and C-terminal truncated constructs complexed with GDP and GppNHp
- Brennwald, P., Kearns, B., Champion, K., Keränen, S., Bankaitis, V. et Novick, P. Cell (1994). **79**: 245-258. Sec9 is a SNAP-25 like component of a yeast SNARE complex that may be the effector of Sec4 function in exocytosis
- Broadie, K., Prokop, A., Bellen, H. J., O'Kane, C. J., Schulze, K. L. et Sweeney, S. T. Neuron (1995). **15**(3): 663-73. Syntaxin and synaptobrevin function downstream of vesicle docking in *Drosophila*
- Brodin, L., Low, P., Gad, H., Gustafsson, J., Pieribone, V. A. et Shupliakov, O. Eur J Neurosci (1997). **9**(12): 2503-11. Sustained neurotransmitter release: new molecular clues
- Brondyk, W. H., McKiernan, C. J., Burstein, E. S. et Macara, I. G. J Biol Chem (1993). **268**(13): 9410-5. Mutants of Rab3A analogous to oncogenic Ras mutants. Sensitivity to Rab3A-GTPase activating protein and Rab3A-guanine nucleotide releasing factor
- Brunger, A. T. Curr Opin Neurobiol (2000). **10**(3): 293-302. Structural insights into the molecular mechanism of Ca²⁺-dependent exocytosis
- Bruss, M., Porzgen, P., Bryan-Lluka, L. J. et Bonisch, H. Brain Res Mol Brain Res (1997). **52**(2): 257-62. The rat norepinephrine transporter: molecular cloning from PC12 cells and functional expression
- Burns, M. E., Sasaki, T., Takai, Y. et Augustine, G. J. J Gen Physiol (1998). **111**(2): 243-55. Rabphilin-3A: a multifunctional regulator of synaptic vesicle traffic
- Burstein, E. S., Brondyk, W. H. et Macara, I. G. J Biol Chem (1992). **267**(32): 22715-8. Amino acid residues in the Ras-like GTPase Rab3A that specify sensitivity to factors that regulate the GTP/GDP cycling of Rab3A
- Burton, J. L., Burns, M. E., Gatti, E., Augustine, G. J. et De Camilli, P. Embo J (1994). **13**(23): 5547-58. Specific interactions of Mss4 with members of the Rab GTPase subfamily
- Carroll, K., Ray, K., Helm, B. et Carey, E. Eur J Cell Biol (2001). **80**(4): 295-302. Differential expression of Rab3 isoforms in high- and low-secreting mast cell lines

- Castillo, P. E., Janz, R., Sudhof, T. C., Tzounopoulos, T., Malenka, R. C. et Nicoll, R. A. Nature (1997). **388**(6642): 590-3. Rab3A is essential for mossy fibre long-term potentiation in the hippocampus
- Castillo, P. E., Schoch, S., Schmitz, F., Sudhof, T. C. et Malenka, R. C. Nature (2002). **415**(6869): 327-30. RIM1alpha is required for presynaptic long-term potentiation
- Chamberlain, L. H., Roth, D., Morgan, A. et Burgoyne, R. D. J Cell Biol (1995). **130**(5): 1063-70. Distinct effects of alpha-SNAP, 14-3-3 proteins, and calmodulin on priming and triggering of regulated exocytosis
- Chanturiya, A., Chernomordik, L. V. et Zimmerberg, J. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1997). **94**(26): 14423-14428. Flickering fusion pores comparable with initial exocytotic pores occur in protein-free phospholipid bilayers
- Chapman, E. R., Hanson, P. I., An, S. et Jahn, R. J Biol Chem (1995). **270**(40): 23667-71. Ca²⁺ regulates the interaction between synaptotagmin and syntaxin 1
- Chavrier, P., Gorvel, J. P., Stelzer, E., Simons, K., Gruenberg, J. et Zerial, M. Nature (1991). **353**(6346): 769-72. Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal
- Chen, T. K., Luo, G. et Ewing, A. G. Anal Chem (1994). **66**(19): 3031-5. Amperometric monitoring of stimulated catecholamine release from rat pheochromocytoma (PC12) cells at the zeptomole level
- Chen, X., Edwards, J. A., Logsdon, C. D., Ernst, S. A. et Williams, J. A. J Biol Chem (2002). **277**(20): 18002-9. Dominant negative Rab3D inhibits amylase release from mouse pancreatic acini
- Chen, Y. A., Scales, S. J., Patel, S. M., Doung, Y. C. et Scheller, R. H. Cell (1999). **97**(2): 165-74. SNARE complex formation is triggered by Ca²⁺ and drives membrane fusion
- Chernomordik, L., Chanturiya, A., Green, J. et Zimmerberg, J. Biophys J (1995). **69**(3): 922-9. The hemifusion intermediate and its conversion to complete fusion: regulation by membrane composition
- Chernomordik, L. V., Melikyan, G. B. et Chizmadzhev, Y. A. Biochim Biophys Acta (1987). **906**(3): 309-52. Biomembrane fusion: a new concept derived from model studies using two interacting planar lipid bilayers
- Chow, R. H., Klingauf, J. et Neher, E. Proc Natl Acad Sci U S A (1994). **91**(26): 12765-9. Time course of Ca²⁺ concentration triggering exocytosis in neuroendocrine cells
- Chow, R. H., von Ruden, L. et Neher, E. Nature (1992). **356**(6364): 60-3. Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells
- Christoforidis, S., Miaczynska, M., Ashman, K., Wilm, M., Zhao, L., Yip, S. C., Waterfield, M. D., Backer, J. M. et Zerial, M. Nat Cell Biol (1999). **1**(4): 249-52. Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors
- Chung, S. H., Joberty, G., Gelino, E. A., Macara, I. G. et Holz, R. W. J Biol Chem (1999). **274**(25): 18113-20. Comparison of the effects on secretion in chromaffin and PC12 cells of Rab3 family members and mutants. Evidence that inhibitory effects are independent of direct interaction with Rabphilin3
- Chung, S. H., Song, W. J., Kim, K., Bednarski, J. J., Chen, J., Prestwich, G. D. et Holz, R. W. J Biol Chem (1998). **273**(17): 10240-8. The C2 domains of Rabphilin3A specifically bind phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate containing vesicles in a Ca²⁺-dependent manner. In vitro characteristics and possible significance
- Chung, S. H., Stabila, P., Macara, I. G. et Holz, R. W. J Neurochem (1997). **69**(1): 164-73. Importance of the Rab3a-GTP binding domain for the intracellular stability and function of Rabphilin3a in secretion
- Chung, S. H., Takai, Y. et Holz, R. W. J Biol Chem (1995). **270**(28): 16714-8. Evidence that the Rab3a-binding protein, rabphilin3a, enhances regulated secretion. Studies in adrenal chromaffin cells
- Clabecq, A., Henry, J. P. et Darchen, F. J Biol Chem (2000). **275**(41): 31786-91. Biochemical characterization of Rab3-GTPase-activating protein reveals a mechanism similar to that of Ras-GAP
- Colliver, T. L., Pyott, S. J., Achalabun, M. et Ewing, A. G. J Neurosci (2000). **20**(14): 5276-82. VMAT-Mediated changes in quantal size and vesicular volume
- Conner, S. D. et Wessel, G. M. Faseb J (2000). **14**(11): 1559-66. A rab3 homolog in sea urchin functions in cell division
- Constantinescu, A. T., Rak, A., Alexandrov, K., Esters, H., Goody, R. S. et Scheidig, A. J. Structure (Camb) (2002). **10**(4): 569-79. Rab-subfamily-specific regions of Ypt7p are structurally different from other RabGTPases

- Coorsen, J. R., Blank, P. S., Tahara, M. et Zimmerberg, J. J Cell Biol (1998). **143**(7): 1845-57. Biochemical and functional studies of cortical vesicle fusion: the SNARE complex and Ca²⁺ sensitivity
- Coppola, T., Perret-Menoud, V., S, L. t., Farnsworth, C. C., Glomset, J. A. et Regazzi, R. Embo J (1999). **18**(21): 5885-5891. Disruption of Rab3-calmodulin interaction, but not other effector interactions, prevents Rab3 inhibition of exocytosis
- Cormont, M., Tanti, J. F., Zahraoui, A., Van Obberghen, E., Tavitian, A. et Le Marchand-Brustel, Y. J Biol Chem (1993). **268**(26): 19491-7. Insulin and okadaic acid induce Rab4 redistribution in adipocytes
- Cremona, O. et De Camilli, P. J Cell Sci (2001). **114**(Pt 6): 1041-52. Phosphoinositides in membrane traffic at the synapse
- Cuif, M. H., Possmayer, F., Zander, H., Bordes, N., Jollivet, F., Couedel-Courteille, A., Janoueix-Lerosey, I., Langsley, G., Bornens, M. et Goud, B. Embo J (1999). **18**(7): 1772-82. Characterization of GAPCenA, a GTPase activating protein for Rab6, part of which associates with the centrosome
- Darchen, F. et Goud, B. Biochimie (2000). **82**(4): 375-84. Multiple aspects of Rab proteins action in the secretory pathway: focus on Rab3 and Rab6
- Darchen, F., Scherman, D., Desnos, C. et Henry, J. P. Biochem Pharmacol (1988). **37**(22): 4381-7. Characteristics of the transport of the quaternary ammonium 1-methyl-4- phenylpyridinium by chromaffin granules
- Darchen, F., Senyshyn, J., Brondyk, W. H., Taatjes, D. J., Holz, R. W., Henry, J. P., Denizot, J. P. et Macara, I. G. J Cell Sci (1995). **108**(Pt 4): 1639-49. The GTPase Rab3a is associated with large dense core vesicles in bovine chromaffin cells and rat PC12 cells
- Darchen, F., Zahraoui, A., Hammel, F., Monteils, M. P., Tavitian, A. et Scherman, D. Proc Natl Acad Sci U S A (1990). **87**(15): 5692-6. Association of the GTP-binding protein Rab3A with bovine adrenal chromaffin granules
- Dascher, C., Ossig, R., Gallwitz, D. et Schmitt, H. D. Mol Cell Biol (1991). **11**(2): 872-85. Identification and structure of four yeast genes (SLY) that are able to suppress the functional loss of YPT1, a member of the RAS superfamily
- Davis, A. F., Bai, J., Fasshauer, D., Wolowick, M. J., Lewis, J. L. et Chapman, E. R. Neuron (1999). **24**(2): 363-76. Kinetics of synaptotagmin responses to Ca²⁺ and assembly with the core SNARE complex onto membranes
- Davletov, B. A., Meunier, F. A., Ashton, A. C., Matsushita, H., Hirst, W. D., Lelianova, V. G., Wilkin, G. P., Dolly, J. O. et Ushkaryov, Y. A. Embo J (1998). **17**(14): 3909-20. Vesicle exocytosis stimulated by alpha-latrotoxin is mediated by latrophilin and requires both external and stored Ca²⁺
- De Blas, G., Michaut, M., Trevino, C. L., Tomes, C. N., Yunes, R., Darszon, A. et Mayorga, L. S. J Biol Chem (2002). **11**: 11. The intraacrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis
- Dirac-Svejstrup, A. B., Soldati, T., Shapiro, A. D. et Pfeffer, S. R. J Biol Chem (1994). **269**(22): 15427-30. Rab-GDI presents functional Rab9 to the intracellular transport machinery and contributes selectivity to Rab9 membrane recruitment
- Dirac-Svejstrup, A. B., Sumizawa, T. et Pfeffer, S. R. Embo J (1997). **16**(3): 465-72. Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI
- Doussau, F., Clabecq, A., Henry, J. P., Darchen, F. et Poulain, B. J Neurosci (1998). **18**(9): 3147-57. Calcium-dependent regulation of rab3 in short-term plasticity
- Dulubova, I., Sugita, S., Hill, S., Hosaka, M., Fernandez, I., Sudhof, T. C. et Rizo, J. Embo J (1999). **18**(16): 4372-82. A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18
- Dumas, J. J., Zhu, Z., Connolly, J. L. et Lambright, D. G. Structure Fold Des (1999). **7**(4): 413-23. Structural basis of activation and GTP hydrolysis in Rab proteins
- Dunant, Y. et Israel, M. Biochimie (2000). **82**(4): 289-302. Neurotransmitter release at rapid synapses
- Duncan, R. R., Don-Wauchope, A. C., Tapechum, S., Shipston, M. J., Chow, R. H. et Estibeiro, P. Biochem J (1999). **342 Pt 3**: 497-501. High-efficiency Semliki Forest virus-mediated transduction in bovine adrenal chromaffin cells
- Duncan, R. R., Greaves, J., Wiegand, U. K., Matskevich, I., Bodammer, G., Apps, D. K., Shipston, M. J. et Chow, R. H. Nature (2003). **422**(6928): 176-80. Functional and spatial segregation of secretory vesicle pools according to vesicle age
- Echard, A., Jollivet, F., Martinez, O., Lacapere, J. J., Rousselet, A., Janoueix-Lerosey, I. et Goud, B. Science (1998). **279**(5350): 580-5. Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6

- Echard, A., Opdam, F. J., de Leeuw, H. J., Jollivet, F., Savelkoul, P., Hendriks, W., Voorberg, J., Goud, B. et Fransen, J. A. Mol Biol Cell (2000). **11**(11): 3819-33. Alternative splicing of the human Rab6A gene generates two close but functionally different isoforms
- El-Amraoui, A., Schonn, J. S., Kussel-Andermann, P., Blanchard, S., Desnos, C., Henry, J. P., Wolfrum, U., Darchen, F. et Petit, C. EMBO Rep (2002). **3**(5): 463-70. MyRIP, a novel Rab effector, enables myosin VIIa recruitment to retinal melanosomes
- Elkind, N. B., Walch-Solimena, C. et Novick, P. J. J Cell Biol (2000). **149**(1): 95-110. The role of the COOH terminus of Sec2p in the transport of post-Golgi vesicles
- Erdman, R. A. et Maltese, W. A. Biochem Biophys Res Commun (2001). **282**(1): 4-9. Different Rab GTPases associate preferentially with alpha or beta GDP- dissociation inhibitors
- Erickson, J. D., Eiden, L. E. et Hoffman, B. J. Proc Natl Acad Sci U S A (1992). **89**(22): 10993-7. Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter
- Espinosa, C., Najera, C., Millan, J. M., Ayuso, C., Baiget, M., Perez-Garrigues, H., Rodrigo, O., Vilela, C. et Beneyto, M. J Med Genet (1998). **35**(5): 391-8. Linkage analysis in Usher syndrome type I (USH1) families from Spain
- Esters, H., Alexandrov, K., Constantinescu, A. T., Goody, R. S. et Scheidig, A. J. J Mol Biol (2000). **298**(1): 111-21. High-resolution crystal structure of *S. cerevisiae* Ypt51(DeltaC15)- GppNHp, a small GTP-binding protein involved in regulation of endocytosis
- Evans, L. L., Lee, A. J., Bridgman, P. C. et Mooseker, M. S. J Cell Sci (1998). **111**(Pt 14): 2055-66. Vesicle-associated brain myosin-V can be activated to catalyze actin- based transport
- Fasshauer, D., Antonin, W., Margittai, M., Pabst, S. et Jahn, R. J Biol Chem (1999). **274**(22): 15440-6. Mixed and non-cognate SNARE complexes. Characterization of assembly and biophysical properties
- Fasshauer, D., Bruns, D., Shen, B., Jahn, R. et Brunger, A. T. J Biol Chem (1997). **272**(7): 4582-90. A structural change occurs upon binding of syntaxin to SNAP-25
- Fasshauer, D., Sutton, R. B., Brunger, A. T. et Jahn, R. Proc Natl Acad Sci U S A (1998). **95**(26): 15781-6. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs
- Fernandez, I., Arac, D., Ubach, J., Gerber, S. H., Shin, O., Gao, Y., Anderson, R. G., Sudhof, T. C. et Rizo, J. Neuron (2001). **32**(6): 1057-69. Three-dimensional structure of the synaptotagmin 1 C2B-domain: synaptotagmin 1 as a phospholipid binding machine
- Fernandez-Chacon, R., Konigstorfer, A., Gerber, S. H., Garcia, J., Matos, M. F., Stevens, C. F., Brose, N., Rizo, J., Rosenmund, C. et Sudhof, T. C. Nature (2001). **410**(6824): 41-9. Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability
- Fernandez-Chacon, R., Shin, O. H., Konigstorfer, A., Matos, M. F., Meyer, A. C., Garcia, J., Gerber, S. H., Rizo, J., Sudhof, T. C. et Rosenmund, C. J Neurosci (2002). **22**(19): 8438-46. Structure/function analysis of Ca²⁺ binding to the C2A domain of synaptotagmin 1
- Fernandez-Chacon, R. et Sudhof, T. C. Annu Rev Physiol (1999). **61**: 753-76. Genetics of synaptic vesicle function: toward the complete functional anatomy of an organelle
- Field, R. B., Kruse, D. H. et Redman, R. S. Histochem J (2001). **33**(2): 71-7. Immunohistochemical localization and mRNA detection of Rab3D and/or Rab3B in rat von Ebner's glands, parotid gland, pancreas, and liver
- Fischer von Mollard, G., Mignery, G. A., Baumert, M., Perin, M. S., Hanson, T. J., Burger, P. M., Jahn, R. et Sudhof, T. C. Proc Natl Acad Sci U S A (1990). **87**(5): 1988-92. rab3 is a small GTP-binding protein exclusively localized to synaptic vesicles
- Fischer von Mollard, G., Stahl, B., Khokhlatchev, A., Sudhof, T. C. et Jahn, R. J Biol Chem (1994). **269**(15): 10971-4. Rab3C is a synaptic vesicle protein that dissociates from synaptic vesicles after stimulation of exocytosis
- Fischer von Mollard, G., Sudhof, T. C. et Jahn, R. Nature (1991). **349**(6304): 79-81. A small GTP-binding protein dissociates from synaptic vesicles during exocytosis
- Fisher, R. J. et Burgoyne, R. D. Pflugers Arch (1999). **437**(5): 754-62. The effect of transfection with Botulinum neurotoxin C1 light chain on exocytosis measured in cell populations and by single-cell amperometry in PC12 cells
- Floor, E., Leventhal, P. S., Wang, Y., Meng, L. et Chen, W. J Neurochem (1995). **64**(2): 689-99. Dynamic storage of dopamine in rat brain synaptic vesicles in vitro

- Fohr, K. J., Warchol, W. et Gratzl, M. Methods Enzymol (1993). **221**: 149-57. Calculation and control of free divalent cations in solutions used for membrane fusion studies
- Foletti, D. L., Blitzer, J. T. et Scheller, R. H. J Neurosci (2001). **21**(15): 5473-83. Physiological modulation of rabphilin phosphorylation
- Fon, E. A., Pothos, E. N., Sun, B. C., Killeen, N., Sulzer, D. et Edwards, R. H. Neuron (1997). **19**(6): 1271-83. Vesicular transport regulates monoamine storage and release but is not essential for amphetamine action
- Foran, P., Lawrence, G. W., Shone, C. C., Foster, K. A. et Dolly, J. O. Biochemistry (1996). **35**(8): 2630-6. Botulinum neurotoxin C1 cleaves both syntaxin and SNAP-25 in intact and permeabilized chromaffin cells: correlation with its blockade of catecholamine release
- Forsberg, E. J. et Pollard, H. B. Neuroscience (1988). **27**(2): 711-5. Ba²⁺-induced ATP release from adrenal medullary chromaffin cells is mediated by Ba²⁺ entry through both voltage- and receptor-gated Ca²⁺ channels
- Francis, S. C., Sunshine, C. et Kirk, K. L. J Biol Chem (2002). **277**(10): 7816-23. Coordinate regulation of catecholamine uptake by rab3 and phosphoinositide 3-kinase
- Fukuda, M. J Biol Chem (2003). **278**(17): 15373-80. Distinct Rab Binding Specificity of Rim1, Rim2, Rabphilin, and Noc2. Identification of a critical determinant of Rab3a/Rab27a recognition by Rim2
- Fukuda, M., Kabayama, H. et Mikoshiba, K. FEBS Lett (2000). **482**(3): 269-72. Drosophila AD3 mutation of synaptotagmin impairs calcium-dependent self-oligomerization activity
- Fukuda, M., Kanno, E., Saegusa, C., Ogata, Y. et Kuroda, T. S. J Biol Chem (2002a). **9**: 9. Slp4-a/granophilin-a regulates dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells
- Fukuda, M. et Kuroda, T. S. J Biol Chem (2002b). **7**: 7. Slac2-c (synaptotagmin-like protein homologue lacking C2 domains-c), a novel linker protein that interacts with Rab27, myosin Va/VIIa, and actin
- Fukuda, M., Kuroda, T. S. et Mikoshiba, K. J Biol Chem (2002c). **277**(14): 12432-6. Slac2-a/melanophilin, the missing link between Rab27 and myosin Va: implications of a tripartite protein complex for melanosome transport
- Fukuda, M., Saegusa, C. et Mikoshiba, K. Biochem Biophys Res Commun (2001). **283**(2): 513-9. Novel splicing isoforms of synaptotagmin-like proteins 2 and 3: identification of the Slp homology domain
- Fukui, K., Sasaki, T., Imazumi, K., Matsuura, Y., Nakanishi, H. et Takai, Y. J Biol Chem (1997). **272**(8): 4655-8. Isolation and characterization of a GTPase activating protein specific for the Rab3 subfamily of small G proteins
- Fykse, E. M. J Neurochem (1998). **71**(4): 1661-9. Depolarization of cerebellar granule cells increases phosphorylation of rabphilin-3A
- Fykse, E. M., Li, C. et Südhof, T. C. J Neurosci (1995). **15**(3 Pt 2): 2385-95. Phosphorylation of rabphilin-3A by Ca²⁺/calmodulin- and cAMP-dependent protein kinases in vitro
- Galli, T. et Haucke, V. Sci STKE (2001). **88**. Cycling of synaptic vesicles : how far? How fast!
- Galli, T., McPherson, P. S. et De Camilli, P. J Biol Chem (1996). **271**(4): 2193-8. The V0 sector of the V-ATPase, synaptobrevin, and synaptophysin are associated on synaptic vesicles in a Triton X-100-resistant, freeze-thawing sensitive, complex
- Garde, J. et Roldan, E. R. FEBS Lett (1996). **391**(3): 263-8. rab 3-peptide stimulates exocytosis of the ram sperm acrosome via interaction with cyclic AMP and phospholipase A2 metabolites
- Gasnier, B., Scherman, D. et Henry, J. P. FEBS Lett (1987). **222**(1): 215-9. Inactivation of the catecholamine transporter during the preparation of chromaffin granule membrane 'ghosts'
- Genazzani, A. A. et Billington, R. A. Trends Pharmacol Sci (2002). **23**(4): 165-7. NAADP: an atypical Ca²⁺-release messenger?
- Geppert, M., Bolshakov, V. Y., Siegelbaum, S. A., Takei, K., De Camilli, P., Hammer, R. E. et Südhof, T. C. Nature (1994a). **369**(6480): 493-7. The role of Rab3A in neurotransmitter release
- Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R. E., Li, C., Rosahl, T. W., Stevens, C. F. et Südhof, T. C. Cell (1994b). **79**(4): 717-27. Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse

- Geppert, M., Goda, Y., Stevens, C. F. et Sudhof, T. C. Nature (1997). **387**(6635): 810-4. The small GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion
- Gevrey, J. C., Laurent, S., Saurin, J. C., Nemoz-Gaillard, E., Regazzi, R., Chevrier, A. M., Chayvialle, J. A. et Abello, J. FEBS Lett (2001). **503**(1): 19-24. Rab3a controls exocytosis in cholecystokinin-secreting cells
- Goud, B., Salminen, A., Walworth, N. C. et Novick, P. J. Cell (1988). **53**(5): 753-68. A GTP-binding protein required for secretion rapidly associates with secretory vesicles and the plasma membrane in yeast
- Greene, L. A. et Tischler, A. S. Proc Natl Acad Sci U S A (1976). **73**(7): 2424-8. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor
- Grote, E., Carr, C. M. et Novick, P. J. J Cell Biol (2000). **151**(2): 439-52. Ordering the final events in yeast exocytosis
- Grote, E. et Novick, P. J. Mol Biol Cell (1999). **10**(12): 4149-61. Promiscuity in Rab-SNARE interactions
- Hales, C. M., Vaerman, J. P. et Goldenring, J. R. J Biol Chem (2002). **277**(52): 50415-21. Rab11 family interacting protein 2 associates with Myosin Vb and regulates plasma membrane recycling
- Hanson, P. I., Roth, R., Morisaki, H., Jahn, R. et Heuser, J. E. Cell (1997). **90**(3): 523-35. Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy
- Haucke, V., Wenk, M. R., Chapman, E. R., Farsad, K. et De Camilli, P. Embo J (2000). **19**(22): 6011-9. Dual interaction of synaptotagmin with mu2- and alpha-adaptin facilitates clathrin-coated pit nucleation
- Hayashi, T., McMahon, H., Yamasaki, S., Binz, T., Hata, Y., Sudhof, T. C. et Niemann, H. Embo J (1994). **13**(21): 5051-61. Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly
- Haynes, L. P., Evans, G. J., Morgan, A. et Burgoyne, R. D. J Biol Chem (2001). **276**(13): 9726-32. A direct inhibitory role for the Rab3-specific effector, Noc2, in Ca²⁺-regulated exocytosis in neuroendocrine cells
- Hazuka, C. D., Foletti, D. L., Hsu, S. C., Kee, Y., Hopf, F. W. et Scheller, R. H. J Neurosci (1999). **19**(4): 1324-34. The sec6/8 complex is located at neurite outgrowth and axonal synapse- assembly domains
- Heidelberger, R., Heinemann, C., Neher, E. et Matthews, G. Nature (1994). **371**(6497): 513-5. Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal
- Helmeste, D. M. et Tang, S. W. Eur J Pharmacol (1995). **280**(2): R5-7. Tyrosine kinase inhibitors regulate serotonin uptake in platelets
- Henry, J. P., Sagne, C., Bedet, C. et Gasnier, B. Neurochem Int (1998). **32**(3): 227-46. The vesicular monoamine transporter: from chromaffin granule to brain
- Hess, D. T., Slater, T. M., Wilson, M. C. et Skene, J. H. J Neurosci (1992). **12**(12): 4634-41. The 25 kDa synaptosomal-associated protein SNAP-25 is the major methionine-rich polypeptide in rapid axonal transport and a major substrate for palmitoylation in adult CNS
- Hoffman, B. J., Mezey, E. et Brownstein, M. J. Science (1991). **254**(5031): 579-80. Cloning of a serotonin transporter affected by antidepressants
- Holz, R. W., Bittner, M. A., Peppers, S. C., Senter, R. A. et Eberhard, D. A. J Biol Chem (1989). **264**(10): 5412-9. MgATP-independent and MgATP-dependent exocytosis. Evidence that MgATP primes adrenal chromaffin cells to undergo exocytosis
- Holz, R. W., Brondyk, W. H., Senter, R. A., Kuizon, L. et Macara, I. G. J Biol Chem (1994). **269**(14): 10229-34. Evidence for the involvement of Rab3A in Ca²⁺-dependent exocytosis from adrenal chromaffin cells
- Horiuchi, H., Giner, A., Hoflack, B. et Zerial, M. J Biol Chem (1995). **270**(19): 11257-62. A GDP/GTP exchange-stimulatory activity for the Rab5-RabGDI complex on clathrin-coated vesicles from bovine brain
- Huang, Z., Ritter, C., Brown, A., Finch, J., Abu-Amer, Y., Ross, P. et Slatopolsky, E. Biochem Biophys Res Commun (1999). **255**(3): 645-51. Cloning and localization of Rab3 isoforms in bovine, rat, and human parathyroid glands
- Hume, A. N., Collinson, L. M., Hopkins, C. R., Strom, M., Barral, D. C., Bossi, G., Griffiths, G. M. et Seabra, M. C. Traffic (2002). **3**(3): 193-202. The leaden Gene Product Is Required with Rab27a to Recruit Myosin Va to Melanosomes in Melanocytes
- Hume, A. N., Collinson, L. M., Rapak, A., Gomes, A. Q., Hopkins, C. R. et Seabra, M. C. J Cell Biol (2001). **152**(4): 795-808. Rab27a regulates the peripheral distribution of melanosomes in melanocytes

- Humeau, Y., Doussau, F., Grant, N. J. et Poulain, B. Biochimie (2000). **82**(5): 427-446. How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release
- Humeau, Y., Doussau, F., Vitiello, F., Greengard, P., Benfenati, F. et Poulain, B. J Neurosci (2001a). **21**(12): 4195-206. Synapsin controls both reserve and releasable synaptic vesicle pools during neuronal activity and short-term plasticity in Aplysia
- Humeau, Y., Vitale, N., Chasserot-Golaz, S., Dupont, J. L., Du, G., Frohman, M. A., Bader, M. F. et Poulain, B. Proc Natl Acad Sci U S A (2001b). **98**(26): 15300-5. A role for phospholipase D1 in neurotransmitter release
- Hunt, J. M., Bommert, K., Charlton, M. P., Kistner, A., Habermann, E., Augustine, G. J. et Betz, H. Neuron (1994). **12**(6): 1269-79. A post-docking role for synaptobrevin in synaptic vesicle fusion
- Iezzi, M., Escher, G., Meda, P., Charollais, A., Baldini, G., Darchen, F., Wollheim, C. B. et Regazzi, R. Mol Endocrinol (1999). **13**(2): 202-12. Subcellular distribution and function of Rab3A, B, C, and D isoforms in insulin-secreting cells
- Iezzi, M., Regazzi, R. et Wollheim, C. B. FEBS Lett (2000). **474**(1): 66-70. The Rab3-interacting molecule RIM is expressed in pancreatic beta-cells and is implicated in insulin exocytosis
- Iida, H., Yoshinaga, Y., Tanaka, S., Toshimori, K. et Mori, T. Dev Biol (1999). **211**(1): 144-55. Identification of Rab3A GTPase as an acrosome-associated small GTP-binding protein in rat sperm
- Israel, M., Meunier, F. M., Morel, N. et Lesbats, B. J Neurochem (1987). **49**(3): 975-82. Calcium-induced desensitization of acetylcholine release from synaptosomes or proteoliposomes equipped with mediators, a presynaptic membrane protein
- Iwasaki, K., Staunton, J., Saifee, O., Nonet, M. et Thomas, J. H. Neuron (1997). **18**(4): 613-22. aex-3 encodes a novel regulator of presynaptic activity in *C. elegans*
- Iwasaki, K. et Toyonaga, R. Embo J (2000). **19**(17): 4806-16. The Rab3 GDP/GTP exchange factor homolog AEX-3 has a dual function in synaptic transmission
- Joberty, G., Stabila, P. F., Coppola, T., Macara, I. G. et Regazzi, R. J Cell Sci (1999). **112**(Pt 20): 3579-87. High affinity Rab3 binding is dispensable for Rabphilin-dependent potentiation of stimulated secretion
- Johannes, L., Doussau, F., Clabecq, A., Henry, J. P., Darchen, F. et Poulain, B. J Cell Sci (1996). **109**(Pt 12): 2875-84. Evidence for a functional link between Rab3 and the SNARE complex
- Johannes, L., Lledo, P. M., Chameau, P., Vincent, J. D., Henry, J. P. et Darchen, F. J Neurochem (1998). **71**(3): 1127-33. Regulation of the Ca²⁺ sensitivity of exocytosis by Rab3a
- Johannes, L., Lledo, P. M., Roa, M., Vincent, J. D., Henry, J. P. et Darchen, F. Embo J (1994). **13**(9): 2029-37. The GTPase Rab3a negatively controls calcium-dependent exocytosis in neuroendocrine cells
- Jones, S., Litt, R. J., Richardson, C. J. et Segev, N. J Cell Biol (1995). **130**(5): 1051-61. Requirement of nucleotide exchange factor for Ypt1 GTPase mediated protein transport
- Jones, S. R., Gainetdinov, R. R., Wightman, R. M. et Caron, M. G. J Neurosci (1998). **18**(6): 1979-86. Mechanisms of amphetamine action revealed in mice lacking the dopamine transporter
- Jordens, I., Fernandez-Borja, M., Marsman, M., Dusseljee, S., Janssen, L., Calafat, J., Janssen, H., Wubbolts, R. et Neefjes, J. Curr Biol (2001). **11**(21): 1680-5. The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors
- Jorgensen, E. M., Hartweg, E., Schuske, K., Nonet, M. L., Jin, Y. et Horvitz, H. R. Nature (1995). **378**(6553): 196-9. Defective recycling of synaptic vesicles in synaptotagmin mutants of *Caenorhabditis elegans*
- Kadota, T., Yamaai, T., Saito, Y., Akita, Y., Kawashima, S., Moroi, K., Inagaki, N. et Kadota, K. J Histochem Cytochem (1996). **44**(9): 989-96. Expression of dopamine transporter at the tips of growing neurites of PC12 cells
- Kapfhamer, D., Valladares, O., Sun, Y., Nolan, P. M., Rux, J. J., Arnold, S. E., Veasey, S. C. et Bucan, M. Nat Genet (2002). **32**(2): 290-5. Mutations in Rab3a alter circadian period and homeostatic response to sleep loss in the mouse
- Karniguan, A., Zahraoui, A. et Tavittian, A. Proc Natl Acad Sci U S A (1993). **90**(16): 7647-51. Identification of small GTP-binding rab proteins in human platelets: thrombin-induced phosphorylation of rab3B, rab6, and rab8 proteins
- Kato, M., Sasaki, T., Imazumi, K., Takahashi, K., Araki, K., Shirataki, H., Matsuura, Y., Ishida, A., Fujisawa, H. et Takai, Y. Biochem Biophys Res Commun (1994). **205**(3): 1776-84. Phosphorylation of Rabphilin-3A by calmodulin-dependent protein kinase II

- Kato, M., Sasaki, T., Ohya, T., Nakanishi, H., Nishioka, H., Imamura, M. et Takai, Y. J Biol Chem (1996). **271**(50): 31775-8. Physical and functional interaction of rabphilin-3A with alpha-actinin
- Kibble, A. V. et Burgoyne, R. D. Pflugers Arch (1996). **431**(3): 464-6. Calmodulin increases the initial rate of exocytosis in adrenal chromaffin cells
- Kim, K. T., Koh, D. S. et Hille, B. J Neurosci (2000). **20**(20): RC101. Loading of oxidizable transmitters into secretory vesicles permits carbon-fiber amperometry
- Klenchin, V. A. et Martin, T. F. Biochimie (2000). **82**(5): 399-407. Priming in exocytosis: attaining fusion-competence after vesicle docking
- Klengel, R., Piiper, A., Pittelkow, S. et Zeuzem, S. Biochem Biophys Res Commun (1997). **236**(3): 719-22. Differential expression of Rab3 isoforms during differentiation of pancreatic acinar cell line AR42J
- Komuro, R., Sasaki, T., Orita, S., Maeda, M. et Takai, Y. Biochem Biophys Res Commun (1996). **219**(2): 435-40. Involvement of rabphilin-3A in Ca²⁺-dependent exocytosis from PC12 cells
- Kopell, W. N. et Westhead, E. W. J Biol Chem (1982). **257**(10): 5707-10. Osmotic pressures of solutions of ATP and catecholamines relating to storage in chromaffin granules
- Kotake, K., Ozaki, N., Mizuta, M., Sekiya, S., Inagaki, N. et Seino, S. J Biol Chem (1997). **272**(47): 29407-10. Noc2, a putative zinc finger protein involved in exocytosis in endocrine cells
- Koushika, S. P., Richmond, J. E., Hadwiger, G., Weimer, R. M., Jorgensen, E. M. et Nonet, M. L. Nat Neurosci (2001). **4**(10): 997-1005. A post-docking role for active zone protein Rim
- Kozminski, K. D., Gutman, D. A., Davila, V., Sulzer, D. et Ewing, A. G. Anal Chem (1998). **70**(15): 3123-30. Voltammetric and pharmacological characterization of dopamine release from single exocytotic events at rat pheochromocytoma (PC12) cells
- Lang, T., Wacker, I., Wunderlich, I., Rohrbach, A., Giese, G., Soldati, T. et Almers, W. Biophys J (2000). **78**(6): 2863-77. Role of actin cortex in the subplasmalemmal transport of secretory granules in PC-12 cells
- Lapierre, L. A., Kumar, R., Hales, C. M., Navarre, J., Bhartur, S. G., Burnette, J. O., Provance, D. W., Jr., Mercer, J. A., Bahler, M. et Goldenring, J. R. Mol Biol Cell (2001). **12**(6): 1843-57. Myosin vb is associated with plasma membrane recycling systems
- Larkin, J. M., Woo, B., Balan, V., Marks, D. L., Oswald, B. J., LaRusso, N. F. et McNiven, M. A. Hepatology (2000). **32**(2): 348-56. Rab3D, a small GTP-binding protein implicated in regulated secretion, is associated with the transcytotic pathway in rat hepatocytes
- Law, G. J., Northrop, A. J. et Mason, W. T. FEBS Lett (1993). **333**(1-2): 56-60. rab3-peptide stimulates exocytosis from mast cells via a pertussis toxin-sensitive mechanism
- Lee, H. C. Curr Biol (2003). **13**(5): R186-8. Calcium Signaling: NAADP Ascends as a New Messenger
- Leenders, A. G., Lopes da Silva, F. H., Ghijsen, W. E. et Verhage, M. Mol Biol Cell (2001). **12**(10): 3095-102. Rab3a is involved in transport of synaptic vesicles to the active zone in mouse brain nerve terminals
- Lentz, B. R., Malinin, V., Haque, M. E. et Evans, K. Curr Opin Struct Biol (2000). **10**(5): 607-15. Protein machines and lipid assemblies: current views of cell membrane fusion
- Leveque, C., Hoshino, T., David, P., Shoji-Kasai, Y., Leys, K., Omori, A., Lang, B., el Far, O., Sato, K., Martin-Moutot, N. et al. Proc Natl Acad Sci U S A (1992). **89**(8): 3625-9. The synaptic vesicle protein synaptotagmin associates with calcium channels and is a putative Lambert-Eaton myasthenic syndrome antigen
- Li, C., Takei, K., Geppert, M., Daniell, L., Stenius, K., Chapman, E. R., Jahn, R., De Camilli, P. et Südhof, T. C. Neuron (1994a). **13**(4): 885-98. Synaptic targeting of rabphilin-3A, a synaptic vesicle Ca²⁺/phospholipid-binding protein, depends on rab3A/3C
- Li, G., Regazzi, R., Balch, W. E. et Wollheim, C. B. FEBS Lett (1993). **327**(2): 145-9. Stimulation of insulin release from permeabilized HIT-T15 cells by a synthetic peptide corresponding to the effector domain of the small GTP-binding protein rab3
- Li, G., Rungger-Brandle, E., Just, I., Jonas, J. C., Aktories, K. et Wollheim, C. B. Mol Biol Cell (1994b). **5**(11): 1199-213. Effect of disruption of actin filaments by Clostridium botulinum C2 toxin on insulin secretion in HIT-T15 cells and pancreatic islets

- Lian, J. P., Stone, S., Jiang, Y., Lyons, P. et Ferro-Novick, S. Nature (1994). **372**(6507): 698-701. Ypt1p implicated in v-SNARE activation
- Lin, C. G., Lin, Y. C., Liu, H. W. et Kao, L. S. Biochem J (1997a). **324**(Pt 1): 85-90. Characterization of Rab3A, Rab3B and Rab3C: different biochemical properties and intracellular localization in bovine chromaffin cells
- Lin, C. G., Pan, C. Y. et Kao, L. S. Biochem Biophys Res Commun (1996). **221**(3): 675-81. Rab3A delayed catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells
- Lin, R. C. et Scheller, R. H. Neuron (1997b). **19**(5): 1087-94. Structural organization of the synaptic exocytosis core complex
- Lindsay, A. J. et McCaffrey, M. W. J Biol Chem (2002). **277**(30): 27193-9. Rab11-FIP2 functions in transferrin recycling and associates with endosomal membranes via its COOH-terminal domain
- Lipschutz, J. H. et Mostov, K. E. Curr Biol (2002). **12**(6): R212-4. Exocytosis: the many masters of the exocyst
- Littleton, J. T., Bai, J., Vyas, B., Desai, R., Baltus, A. E., Garment, M. B., Carlson, S. D., Ganetzky, B. et Chapman, E. R. J Neurosci (2001). **21**(5): 1421-33. synaptotagmin mutants reveal essential functions for the C2B domain in Ca²⁺-triggered fusion and recycling of synaptic vesicles in vivo
- Littleton, J. T., Chapman, E. R., Kreber, R., Garment, M. B., Carlson, S. D. et Ganetzky, B. Neuron (1998). **21**(2): 401-13. Temperature-sensitive paralytic mutations demonstrate that synaptic exocytosis requires SNARE complex assembly and disassembly
- Liu, J. et Misler, S. J Neurosci (1998a). **18**(16): 6113-25. alpha-Latrotoxin alters spontaneous and depolarization-evoked quantal release from rat adrenal chromaffin cells: evidence for multiple modes of action
- Liu, X., Ondek, B. et Williams, D. S. Nat Genet (1998b). **19**(2): 117-8. Mutant myosin VIIa causes defective melanosome distribution in the RPE of shaker-1 mice
- Liu, Y., Peter, D., Roghani, A., Schuldiner, S., Prive, G. G., Eisenberg, D., Brecha, N. et Edwards, R. H. Cell (1992). **70**(4): 539-51. A cDNA that suppresses MPP⁺ toxicity encodes a vesicular amine transporter
- Livett, B. G. Physiol Rev (1984). **64**(4): 1103-61. Adrenal medullary chromaffin cells in vitro
- Lledo, P. M., Vernier, P., Vincent, J. D., Mason, W. T. et Zorec, R. Nature (1993). **364**(6437): 540-4. Inhibition of Rab3B expression attenuates Ca(2+)-dependent exocytosis in rat anterior pituitary cells
- Lonart, G., Janz, R., Johnson, K. M. et Sudhof, T. C. Neuron (1998a). **21**(5): 1141-50. Mechanism of action of rab3A in mossy fiber LTP
- Lonart, G. et Sudhof, T. C. J Neurosci (1998b). **18**(2): 634-40. Region-specific phosphorylation of rabphilin in mossy fiber nerve terminals of the hippocampus
- Luo, H. R., Saiardi, A., Nagata, E., Ye, K., Yu, H., Jung, T. S., Luo, X., Jain, S., Sawa, A. et Snyder, S. H. Neuron (2001). **31**(3): 439-51. GRAB: a physiologic guanine nucleotide exchange factor for Rab3A, which interacts with inositol hexakisphosphate kinase
- Lupashin, V. V. et Waters, M. G. Science (1997). **276**(5316): 1255-8. t-SNARE activation through transient interaction with a rab-like guanosine triphosphatase
- Madison, D. L., Kruger, W. H., Kim, T. et Pfeiffer, S. E. J Neurosci Res (1996). **45**(3): 258-68. Differential expression of rab3 isoforms in oligodendrocytes and astrocytes
- Mansvelter, H. D. et Kits, K. S. Prog Neurobiol (2000). **62**(4): 427-41. Calcium channels and the release of large dense core vesicles from neuroendocrine cells: spatial organization and functional coupling
- Marks, B., Stowell, M. H., Vallis, Y., Mills, I. G., Gibson, A., Hopkins, C. R. et McMahon, H. T. Nature (2001a). **410**(6825): 231-5. GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis
- Marks, M. S. et Seabra, M. C. Nat Rev Mol Cell Biol (2001b). **2**(10): 738-48. The melanosome: membrane dynamics in black and white
- Marqueze, B., Berton, F. et Seagar, M. Biochimie (2000). **82**(5): 409-20. Synaptotagmins in membrane traffic: which vesicles do the tagmins tag?
- Martelli, A. M., Baldini, G., Tabellini, G., Koticha, D. et Bareggi, R. Traffic (2000). **1**(12): 976-86. Rab3A and Rab3D control the total granule number and the fraction of granules docked at the plasma membrane in PC12 cells

- Martelli, A. M., Bareggi, R., Baldini, G., Scherer, P. E. et Lodish, H. F. FEBS Lett (1995). **368**(2): 271-5. Diffuse vesicular distribution of Rab3D in the polarized neuroendocrine cell line AtT-20
- Martin, T. F. Annu Rev Cell Dev Biol (1998). **14**: 231-64. Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking
- Martin, T. F. Neuron (2002). **34**(1): 9-12. Prime movers of synaptic vesicle exocytosis
- Masumoto, N., Ikebuchi, Y., Tahara, M., Yokoi, T., Tasaka, K., Miyake, A. et Murata, Y. J Exp Zool (1998). **280**(1): 91-6. Expression of Rab3A in the cortical region in mouse metaphase II eggs
- Masumoto, N., Sasaki, T., Tahara, M., Mammoto, A., Ikebuchi, Y., Tasaka, K., Tokunaga, M., Takai, Y. et Miyake, A. J Cell Biol (1996). **135**(6 Pt 2): 1741-7. Involvement of Rabphilin-3A in cortical granule exocytosis in mouse eggs
- Matesic, L. E., Yip, R., Reuss, A. E., Swing, D. A., O'Sullivan, T. N., Fletcher, C. F., Copeland, N. G. et Jenkins, N. A. Proc Natl Acad Sci U S A (2001). **98**(18): 10238-43. Mutations in Mlph, encoding a member of the Rab effector family, cause the melanosome transport defects observed in leaden mice
- Matter, K., Dreyer, F. et Aktories, K. J Neurochem (1989). **52**(2): 370-6. Actin involvement in exocytosis from PC12 cells: studies on the influence of botulinum C2 toxin on stimulated noradrenaline release
- Mayer, A., Wickner, W. et Haas, A. Cell (1996). **85**(1): 83-94. Sec18p (NSF)-driven release of Sec17p (alpha-SNAP) can precede docking and fusion of yeast vacuoles
- McKiernan, C. J., Brondyk, W. H. et Macara, I. G. J Biol Chem (1993). **268**(32): 24449-52. The Rab3A GTPase interacts with multiple factors through the same effector domain. Mutational analysis of cross-linking of Rab3A to a putative target protein
- McKiernan, C. J., Stabila, P. F. et Macara, I. G. Mol Cell Biol (1996). **16**(9): 4985-95. Role of the Rab3A-binding domain in targeting of rabphilin-3A to vesicle membranes of PC12 cells
- Menasche, G., Pastural, E., Feldmann, J., Certain, S., Ersoy, F., Dupuis, S., Wulffraat, N., Bianchi, D., Fischer, A., Le Deist, F. et de Saint Basile, G. Nat Genet (2000). **25**(2): 173-6. Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome
- Mercer, J. A., Seperack, P. K., Strobel, M. C., Copeland, N. G. et Jenkins, N. A. Nature (1991). **349**(6311): 709-13. Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus
- Merithew, E., Hatherly, S., Dumas, J. J., Lawe, D. C., Heller-Harrison, R. et Lambright, D. G. J Biol Chem (2001). **276**(17): 13982-8. Structural plasticity of an invariant hydrophobic triad in the switch regions of Rab GTPases is a determinant of effector recognition
- Michaut, M., Tomes, C. N., De Blas, G., Yunes, R. et Mayorga, L. S. Proc Natl Acad Sci U S A (2000). **97**(18): 9996-10001. Calcium-triggered acrosomal exocytosis in human spermatozoa requires the coordinated activation of Rab3A and N-ethylmaleimide-sensitive factor
- Miller, K. J. et Hoffman, B. J. J Biol Chem (1994). **269**(44): 27351-6. Adenosine A3 receptors regulate serotonin transport via nitric oxide and cGMP
- Mironov, S. L., Sokolov Yu, V., Chanturiya, A. N. et Lishko, V. K. Biochim Biophys Acta (1986). **862**(1): 185-98. Channels produced by spider venoms in bilayer lipid membrane: mechanisms of ion transport and toxic action
- Miyazaki, M., Shirataki, H., Kohno, H., Kaibuchi, K., Tsugita, A. et Takai, Y. Biochem Biophys Res Commun (1994). **205**(1): 460-6. Identification as beta-adducin of a protein interacting with rabphilin-3A in the presence of Ca²⁺ and phosphatidylserine
- Mizoguchi, A., Yano, Y., Hamaguchi, H., Yanagida, H., Ide, C., Zahraoui, A., Shirataki, H., Sasaki, T. et Takai, Y. Biochem Biophys Res Commun (1994). **202**(3): 1235-43. Localization of Rabphilin-3A on the synaptic vesicle
- Muallem, S., Kwiatkowska, K., Xu, X. et Yin, H. L. J Cell Biol (1995). **128**(4): 589-98. Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells
- Nagano, F., Sasaki, T., Fukui, K., Asakura, T., Imazumi, K. et Takai, Y. J Biol Chem (1998). **273**(38): 24781-5. Molecular cloning and characterization of the noncatalytic subunit of the Rab3 subfamily-specific GTPase-activating protein
- Nagashima, K., Torii, S., Yi, Z., Igarashi, M., Okamoto, K., Takeuchi, T. et Izumi, T. FEBS Lett (2002). **517**(1-3): 233-8. Melanophilin directly links Rab27a and myosin Va through its distinct coiled-coil regions

- Nagata, K., Itoh, H., Katada, T., Takenaka, K., Ui, M., Kaziro, Y. et Nozawa, Y. J Biol Chem (1989). **264**(29): 17000-5. Purification, identification, and characterization of two GTP-binding proteins with molecular weights of 25,000 and 21,000 in human platelet cytosol. One is the rap1/smg21/Krev-1 protein and the other is a novel GTP-binding protein
- Nagata, K., Okano, Y. et Nozawa, Y. Thromb Haemost (1997). **77**(2): 368-75. Differential expression of low Mr GTP-binding proteins in human megakaryoblastic leukemia cell line, MEG-01, and their possible involvement in the differentiation process
- Nagata, K., Satoh, T., Itoh, H., Kozasa, T., Okano, Y., Doi, T., Kaziro, Y. et Nozawa, Y. FEBS Lett (1990). **275**(1-2): 29-32. The ram: a novel low molecular weight GTP-binding protein cDNA from a rat megakaryocyte library
- Nakata, T. et Hirokawa, N. J Neurosci (1992). **12**(6): 2186-97. Organization of cortical cytoskeleton of cultured chromaffin cells and involvement in secretion as revealed by quick-freeze, deep-etching, and double-label immunoelectron microscopy
- Neves, G., Neef, A. et Lagnado, L. J Physiol (2001). **535**(Pt 3): 809-24. The actions of barium and strontium on exocytosis and endocytosis in the synaptic terminal of goldfish bipolar cells
- Nichols, B. J., Ungermann, C., Pelham, H. R., Wickner, W. T. et Haas, A. Nature (1997). **387**(6629): 199-202. Homotypic vacuolar fusion mediated by t- and v-SNAREs
- Nicholson, K. L., Munson, M., Miller, R. B., Filip, T. J., Fairman, R. et Hughson, F. M. Nat Struct Biol (1998). **5**(9): 793-802. Regulation of SNARE complex assembly by an N-terminal domain of the t-SNARE Sso1p
- Nielsen, E., Christoforidis, S., Uttenweiler-Joseph, S., Miaczynska, M., Dewitte, F., Wilm, M., Hoflack, B. et Zerial, M. J Cell Biol (2000). **151**(3): 601-12. Rabenosyn-5, a novel Rab5 effector, is complexed with hVPS45 and recruited to endosomes through a FYVE finger domain
- Nishio, H., Nezasa, K. et Nakata, Y. Eur J Pharmacol (1995). **288**(2): 149-55. Role of calcium ion in platelet serotonin uptake regulation
- Nishio, H., Suda, T., Sawada, K., Miyamoto, T., Koike, T. et Yamaguchi, Y. Biochim Biophys Acta (1999). **1444**(2): 283-90. Molecular cloning of cDNA encoding human Rab3D whose expression is upregulated with myeloid differentiation
- Nonet, M. L., Holgado, A. M., Brewer, F., Serpe, C. J., Norbeck, B. A., Holleran, J., Wei, L., Hartweg, E., Jorgensen, E. M. et Alfonso, A. Mol Biol Cell (1999). **10**(7): 2343-60. UNC-11, a *Caenorhabditis elegans* AP180 homologue, regulates the size and protein composition of synaptic vesicles
- Nonet, M. L., Staunton, J. E., Kilgard, M. P., Fergestad, T., Hartweg, E., Horvitz, H. R., Jorgensen, E. M. et Meyer, B. J. J Neurosci (1997). **17**(21): 8061-73. *Caenorhabditis elegans* rab-3 mutant synapses exhibit impaired function and are partially depleted of vesicles
- Novick, P. et Guo, W. Trends Cell Biol (2002). **12**(6): 247-9. Ras family therapy: Rab, Rho and Ral talk to the exocyst
- Numata, S., Shirataki, H., Hagi, S., Yamamoto, T. et Takai, Y. Biochem Biophys Res Commun (1994). **203**(3): 1927-34. Phosphorylation of Rabphilin-3A, a putative target protein for Rab3A, by cyclic AMP-dependent protein kinase
- Nuoffer, C., Wu, S. K., Dascher, C. et Balch, W. E. Mol Biol Cell (1997). **8**(7): 1305-16. Mss4 does not function as an exchange factor for Rab in endoplasmic reticulum to Golgi transport
- Oberhauser, A. F., Balan, V., Fernandez-Badilla, C. L. et Fernandez, J. M. FEBS Lett (1994). **339**(1-2): 171-4. RT-PCR cloning of Rab3 isoforms expressed in peritoneal mast cells
- Oberhauser, A. F., Monck, J. R., Balch, W. E. et Fernandez, J. M. Nature (1992). **360**(6401): 270-3. Exocytotic fusion is activated by Rab3a peptides
- Oheim, M. et Stuhmer, W. Eur Biophys J (2000). **29**(2): 67-89. Tracking chromaffin granules on their way through the actin cortex
- Ohnishi, H., Ernst, S. A., Wys, N., McNiven, M. et Williams, J. A. Am J Physiol (1996). **271**(3 Pt 1): G531-8. Rab3D localizes to zymogen granules in rat pancreatic acini and other exocrine glands
- Ohnishi, H., Samuelson, L. C., Yule, D. I., Ernst, S. A. et Williams, J. A. J Clin Invest (1997). **100**(12): 3044-52. Overexpression of Rab3D enhances regulated amylase secretion from pancreatic acini of transgenic mice
- Ohya, T., Sasaki, T., Kato, M. et Takai, Y. J Biol Chem (1998). **273**(1): 613-7. Involvement of Rabphilin3 in endocytosis through interaction with Rabaptin5
- Ohyama, A., Komiya, Y. et Igarashi, M. Biochem Biophys Res Commun (2001). **280**(4): 988-91. Globular tail of myosin-V is bound to vamp/synaptobrevin

- Oishi, H., Sasaki, T., Nagano, F., Ikeda, W., Ohya, T., Wada, M., Ide, N., Nakanishi, H. et Takai, Y. J Biol Chem (1998). **273**(51): 34580-5. Localization of the Rab3 small G protein regulators in nerve terminals and their involvement in Ca²⁺-dependent exocytosis
- Oishi, H., Sasaki, T. et Takai, Y. Biochem Biophys Res Commun (1996). **229**(2): 498-503. Interaction of both the C2A and C2B domains of rabphilin3 with Ca²⁺ and phospholipid
- Okabe, T., Sugimoto, N. et Matsuda, M. Biochem Biophys Res Commun (1992). **186**(2): 1006-11. Calmodulin is involved in catecholamine secretion from digitonin- permeabilized bovine adrenal medullary chromaffin cells
- Oliver, T. N., Berg, J. S. et Cheney, R. E. Cell Mol Life Sci (1999). **56**(3-4): 243-57. Tails of unconventional myosins
- Ostermeier, C. et Brunger, A. T. Cell (1999). **96**(3): 363-74. Structural basis of Rab effector specificity: crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of rabphilin- 3A
- Padfield, P. J., Balch, W. E. et Jamieson, J. D. Proc Natl Acad Sci U S A (1992). **89**(5): 1656-60. A synthetic peptide of the rab3a effector domain stimulates amylase release from permeabilized pancreatic acini
- Park, J. B., Farnsworth, C. C. et Glomset, J. A. J Biol Chem (1997). **272**(33): 20857-65. Ca²⁺/calmodulin causes Rab3A to dissociate from synaptic membranes
- Parlati, F., McNew, J. A., Fukuda, R., Miller, R., Sollner, T. H. et Rothman, J. E. Nature (2000). **407**(6801): 194-8. Topological restriction of SNARE-dependent membrane fusion
- Parlati, F., Varlamov, O., Paz, K., McNew, J. A., Hurtado, D., Sollner, T. H. et Rothman, J. E. Proc Natl Acad Sci U S A (2002). **99**(8): 5424-9. Distinct SNARE complexes mediating membrane fusion in Golgi transport based on combinatorial specificity
- Parsons, S. M., Prior, C. et Marshall, I. G. Int Rev Neurobiol (1993). **35**: 279-390. Acetylcholine transport, storage, and release
- Pastural, E., Barrat, F. J., Dufourcq-Lagelouse, R., Certain, S., Sanal, O., Jabado, N., Seger, R., Griscelli, C., Fischer, A. et de Saint Basile, G. Nat Genet (1997). **16**(3): 289-92. Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-Va gene
- Pastural, E., Ersoy, F., Yalman, N., Wulffraat, N., Grillo, E., Ozkinay, F., Tezcan, I., Gedikoglu, G., Philippe, N., Fischer, A. et de Saint Basile, G. Genomics (2000). **63**(3): 299-306. Two genes are responsible for Griscelli syndrome at the same 15q21 locus
- Pavlos, N. J., Xu, J., Papadimitriou, J. M. et Zheng, M. H. J Mol Endocrinol (2001). **27**(1): 117-22. Molecular cloning of the mouse homologue of Rab3c
- Pereira-Leal, J. B. et Seabra, M. C. J Mol Biol (2000). **301**(4): 1077-87. The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily
- Perez, F., Lledo, P. M., Karagogeos, D., Vincent, J. D., Prochiantz, A. et Ayala, J. Mol Endocrinol (1994). **8**(9): 1278-87. Rab3A and Rab3B carboxy-terminal peptides are both potent and specific inhibitors of prolactin release by rat cultured anterior pituitary cells
- Perin, M. S., Fried, V. A., Mignery, G. A., Jahn, R. et Sudhof, T. C. Nature (1990). **345**(6272): 260-3. Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C
- Peters, C., Andrews, P. D., Stark, M. J., Cesaro-Tadic, S., Glatz, A., Podtelejnikov, A., Mann, M. et Mayer, A. Science (1999). **285**(5430): 1084-7. Control of the terminal step of intracellular membrane fusion by protein phosphatase 1
- Peters, C., Bayer, M. J., Buhler, S., Andersen, J. S., Mann, M. et Mayer, A. Nature (2001). **409**(6820): 581-8. Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion
- Peters, C. et Mayer, A. Nature (1998). **396**(6711): 575-80. Ca²⁺/calmodulin signals the completion of docking and triggers a late step of vacuole fusion
- Pfeffer, S. R. Curr Opin Cell Biol (1994). **6**(4): 522-6. Rab GTPases: master regulators of membrane trafficking
- Piiper, A., Leser, J., Lutz, M. P., Beil, M. et Zeuzem, S. Biochem Biophys Res Commun (2001). **287**(3): 746-51. Subcellular distribution and function of Rab3A-D in pancreatic acinar AR42J cells

- Piiper, A., Stryjek-Kaminska, D., Jahn, R. et Zeuzem, S. *Biochem J* (1995). **309**(Pt 2): 621-7. Stimulation of inositol 1,4,5-trisphosphate production by peptides corresponding to the effector domain of different Rab3 isoforms and cross-linking of an effector domain peptide target
- Polzin, A., Shipitsin, M., Goi, T., Feig, L. A. et Turner, T. J. *Mol Cell Biol* (2002). **22**(6): 1714-22. Ral-GTPase influences the regulation of the readily releasable pool of synaptic vesicles
- Pombo, I., Martin-Verdeaux, S., Iannascoli, B., Le Mao, J., Deriano, L., Rivera, J. et Blank, U. *J Biol Chem* (2001). **276**(46): 42893-900. IgE Receptor Type I-dependent Regulation of a Rab3D-associated Kinase. A possible link in the Ca²⁺-dependent assembly of SNARE complexes
- Pothos, E., Desmond, M. et Sulzer, D. *J Neurochem* (1996). **66**(2): 629-36. L-3,4-dihydroxyphenylalanine increases the quantal size of exocytotic dopamine release in vitro
- Pothos, E. N., Davila, V. et Sulzer, D. *J Neurosci* (1998a). **18**(11): 4106-18. Presynaptic recording of quanta from midbrain dopamine neurons and modulation of the quantal size
- Pothos, E. N., Larsen, K. E., Krantz, D. E., Liu, Y., Haycock, J. W., Setlik, W., Gershon, M. D., Edwards, R. H. et Sulzer, D. *J Neurosci* (2000). **20**(19): 7297-306. Synaptic vesicle transporter expression regulates vesicle phenotype and quantal size
- Pothos, E. N., Przedborski, S., Davila, V., Schmitz, Y. et Sulzer, D. *J Neurosci* (1998b). **18**(15): 5575-85. D2-Like dopamine autoreceptor activation reduces quantal size in PC12 cells
- Prekeris, R. et Terrian, D. M. *J Cell Biol* (1997). **137**(7): 1589-601. Brain myosin V is a synaptic vesicle-associated motor protein: evidence for a Ca²⁺-dependent interaction with the synaptobrevin-synaptophysin complex
- Qian, Y., Galli, A., Ramamoorthy, S., Risso, S., DeFelice, L. J. et Blakely, R. D. *J Neurosci* (1997). **17**(1): 45-57. Protein kinase C activation regulates human serotonin transporters in HEK-293 cells via altered cell surface expression
- Qian, Y., Melikian, H. E., Moore, K. R., Duke, B. J. et Blakely, R. D. *Soc. Neurosci. Abstr.* (1995). **21**: 344-7. Phosphorylation of serotonin transporter domains and the role of phosphorylation in acute transporter regulation
- Raffaniello, R. D., Lin, J., Wang, F. et Raufman, J. P. *Biochim Biophys Acta* (1996). **1311**(2): 111-6. Expression of Rab3D in dispersed chief cells from guinea pig stomach
- Ramamoorthy, S. et Blakely, R. D. *Science* (1999). **285**(5428): 763-6. Phosphorylation and sequestration of serotonin transporters differentially modulated by psychostimulants
- Redecker, P., Cetin, Y. et Grube, D. *Neuroendocrinology* (1995). **62**(2): 101-10. Differential distribution of synaptotagmin I and rab3 in the anterior pituitary of four mammalian species
- Regazzi, R., Kikuchi, A., Takai, Y. et Wollheim, C. B. *J Biol Chem* (1992). **267**(25): 17512-9. The small GTP-binding proteins in the cytosol of insulin-secreting cells are complexed to GDP dissociation inhibitor proteins
- Regazzi, R., Ravazzola, M., Iezzi, M., Lang, J., Zahraoui, A., Andereggen, E., Morel, P., Takai, Y. et Wollheim, C. B. *J Cell Sci* (1996). **109**(Pt 9): 2265-73. Expression, localization and functional role of small GTPases of the Rab3 family in insulin-secreting cells
- Rhee, J. S., Betz, A., Pyott, S., Reim, K., Varoqueaux, F., Augustin, I., Hesse, D., Sudhof, T. C., Takahashi, M., Rosenmund, C. et Brose, N. *Cell* (2002). **108**(1): 121-33. Beta phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs
- Richmond, J. E., Weimer, R. M. et Jorgensen, E. M. *Nature* (2001). **412**(6844): 338-41. An open form of syntaxin bypasses the requirement for UNC-13 in vesicle priming
- Riedel, D., Antonin, W., Fernandez-Chacon, R., Alvarez de Toledo, G., Jo, T., Geppert, M., Valentijn, J. A., Valentijn, K., Jamieson, J. D., Sudhof, T. C. et Jahn, R. *Mol Cell Biol* (2002). **22**(18): 6487-97. Rab3D is not required for exocrine exocytosis but for maintenance of normally sized secretory granules
- Roa, M., Paumet, F., Le Mao, J., David, B. et Blank, U. *J Immunol* (1997). **159**(6): 2815-23. Involvement of the ras-like GTPase rab3d in RBL-2H3 mast cell exocytosis following stimulation via high affinity IgE receptors (Fc epsilonRI)
- Robinson, I. M., Finnegan, J. M., Monck, J. R., Wightman, R. M. et Fernandez, J. M. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1995). **92**(7): 2474-8. Colocalization of calcium entry and exocytotic release sites in adrenal chromaffin cells
- Robitaille, R., Garcia, M. L., Kaczorowski, G. J. et Charlton, M. P. *Neuron* (1993). **11**(4): 645-55. Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release

- Rose, S. D., Lejen, T., Casaletti, L., Larson, R. E., Pene, T. D. et Trifaro, J. M. J Neurochem (2003). **85**(2): 287-98. Myosins II and V in chromaffin cells: myosin V is a chromaffin vesicle molecular motor involved in secretion
- Rosenmund, C. et Stevens, C. F. Neuron (1996). **16**(6): 1197-207. Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses
- Rowe, J., Calegari, F., Taverna, E., Longhi, R. et Rosa, P. J Cell Sci (2001). **114**(Pt 18): 3323-32. Syntaxin 1A is delivered to the apical and basolateral domains of epithelial cells: the role of munc-18 proteins
- Rudolf, R., Kogel, T., Kuznetsov, S. A., Salm, T., Schlicker, O., Hellwig, A., Hammer, J. A., 3rd et Gerdes, H. H. J Cell Sci (2003). **116**(Pt 7): 1339-48. Myosin Va facilitates the distribution of secretory granules in the F- actin rich cortex of PC12 cells
- Rutter, G. A. Biochem J (2003). **373**(Pt 2): e3-4. Calcium signalling: NAADP comes out of the shadows
- Rybin, V., Ullrich, O., Rubino, M., Alexandrov, K., Simon, I., Seabra, M. C., Goody, R. et Zerial, M. Nature (1996). **383**(6597): 266-9. GTPase activity of Rab5 acts as a timer for endocytic membrane fusion
- Saegusa, C., Fukuda, M. et Mikoshiba, K. J Biol Chem (2002). **277**(27): 24499-505. Synaptotagmin V is targeted to dense-core vesicles that undergo calcium- dependent exocytosis in PC12 cells
- Salminen, A. et Novick, P. J. Cell (1987). **49**(4): 527-38. A ras-like protein is required for a post-Golgi event in yeast secretion
- Sankaranarayanan, S., Atluri, P. P. et Ryan, T. A. Nat Neurosci (2003). **6**(2): 127-35. Actin has a molecular scaffolding, not propulsive, role in presynaptic function
- Sasaki, T., Kikuchi, A., Araki, S., Hata, Y., Isomura, M., Kuroda, S. et Takai, Y. J Biol Chem (1990). **265**(4): 2333-7. Purification and characterization from bovine brain cytosol of a protein that inhibits the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein
- Schiavo, G., Poulain, B., Rossetto, O., Benfenati, F., Tauc, L. et Montecucco, C. Embo J (1992). **11**(10): 3577-83. Tetanus toxin is a zinc protein and its inhibition of neurotransmitter release and protease activity depend on zinc
- Schiavo, G., Rossetto, O., Benfenati, F., Poulain, B. et Montecucco, C. Ann N Y Acad Sci (1994). **710**: 65-75. Tetanus and botulinum neurotoxins are zinc proteases specific for components of the neuroexocytosis apparatus
- Schluter, O. M., Khvotchev, M. V., Jahn, R. et Sudhof, T. C. J Biol Chem (2002). **6**: 6. Localization versus function of Rab3 proteins: Evidence for a common regulatory role in controlling fusion
- Schlüter, O. M., Schnell, E., Verhage, M., Tzonopoulos, T., Nicoll, R. A., Janz, R., Malenka, R. C., Geppert, M. et Sudhof, T. C. J Neurosci (1999). **19**(14): 5834-46. Rabphilin knock-out mice reveal that rabphilin is not required for rab3 function in regulating neurotransmitter release
- Schmidt, A., Wolde, M., Thiele, C., Fest, W., Kratzin, H., Podtelejnikov, A. V., Witke, W., Huttner, W. B. et Soling, H. D. Nature (1999). **401**(6749): 133-41. Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid
- Schmitt, H. D., Puzicha, M. et Gallwitz, D. Cell (1988). **53**(4): 635-47. Study of a temperature-sensitive mutant of the ras-related YPT1 gene product in yeast suggests a role in the regulation of intracellular calcium
- Schneggenburger, R. et Neher, E. Nature (2000). **406**(6798): 889-93. Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse
- Schoch, S., Castillo, P. E., Jo, T., Mukherjee, K., Geppert, M., Wang, Y., Schmitz, F., Malenka, R. C. et Sudhof, T. C. Nature (2002). **415**(6869): 321-6. RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone
- Schoch, S., Deak, F., Konigstorfer, A., Mozhayeva, M., Sara, Y., Sudhof, T. C. et Kavalali, E. T. Science (2001). **294**(5544): 1117-22. SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice
- Schonn, J. S., Desnos, C., Henry, J. P. et Darchen, F. J Neurochem (2003). **84**(4): 669-77. Transmitter uptake and release in PC12 cells overexpressing plasma membrane monoamine transporters
- Schroeder, T. J., Jankowski, J. A., Senyshyn, J., Holz, R. W. et Wightman, R. M. J Biol Chem (1994). **269**(25): 17215-20. Zones of exocytotic release on bovine adrenal medullary cells in culture
- Scott, G. et Zhao, Q. J Invest Dermatol (2001). **116**(2): 296-304. Rab3a and SNARE proteins: potential regulators of melanosome movement

- Seabra, M. C., Ho, Y. K. et Anant, J. S. J Biol Chem (1995). **270**(41): 24420-7. Deficient geranylgeranylation of Ram/Rab27 in choroideremia
- Segev, N., Mulholland, J. et Botstein, D. Cell (1988). **52**(6): 915-24. The yeast GTP-binding YPT1 protein and a mammalian counterpart are associated with the secretion machinery
- Sever, S., Damke, H. et Schmid, S. L. J Cell Biol (2000). **150**(5): 1137-48. Dynamin:GTP controls the formation of constricted coated pits, the rate limiting step in clathrin-mediated endocytosis
- Sever, S., Muhlberg, A. B. et Schmid, S. L. Nature (1999). **398**(6727): 481-6. Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis
- Seward, E. P., Chernevskaya, N. I. et Nowycky, M. C. J Neurosci (1996). **16**(4): 1370-9. Ba²⁺ ions evoke two kinetically distinct patterns of exocytosis in chromaffin cells, but not in neurohypophysial nerve terminals
- Shao, X., Davletov, B. A., Sutton, R. B., Sudhof, T. C. et Rizo, J. Science (1996). **273**(5272): 248-51. Bipartite Ca²⁺-binding motif in C2 domains of synaptotagmin and protein kinase C
- Shao, X., Li, C., Fernandez, I., Zhang, X., Sudhof, T. C. et Rizo, J. Neuron (1997). **18**(1): 133-42. Synaptotagmin-syntaxin interaction: the C2 domain as a Ca²⁺-dependent electrostatic switch
- Shen, F. et Seabra, M. C. J Biol Chem (1996). **271**(7): 3692-8. Mechanism of digeranylgeranylation of Rab proteins. Formation of a complex between monogeranylgeranyl-Rab and Rab escort protein
- Shibata, H., Omata, W., Suzuki, Y., Tanaka, S. et Kojima, I. J Biol Chem (1996). **271**(16): 9704-9. A synthetic peptide corresponding to the Rab4 hypervariable carboxyl-terminal domain inhibits insulin action on glucose transport in rat adipocytes
- Shin, O. H., Rizo, J. et Sudhof, T. C. Nat Neurosci (2002). **5**(7): 649-56. Synaptotagmin function in dense core vesicle exocytosis studied in cracked PC12 cells
- Shirataki, H., Kaibuchi, K., Sakoda, T., Kishida, S., Yamaguchi, T., Wada, K., Miyazaki, M. et Takai, Y. Mol Cell Biol (1993). **13**(4): 2061-8. Rabphilin-3A, a putative target protein for smg p25A/rab3A p25 small GTP-binding protein related to synaptotagmin
- Shirataki, H., Kaibuchi, K., Yamaguchi, T., Wada, K., Horiuchi, H. et Takai, Y. J Biol Chem (1992). **267**(16): 10946-9. A possible target protein for smg-25A/rab3A small GTP-binding protein
- Shirataki, H., Yamamoto, T., Hagi, S., Miura, H., Oishi, H., Jin-no, Y., Senbonmatsu, T. et Takai, Y. J. Biol. Chem. (1994). **269**: 32717-32720. Rabphilin-3A is associated with synaptic vesicles through a vesicle protein in a manner independent of Rab3A.
- Short, B. et Barr, F. A. Curr Biol (2002). **12**(1): R18-20. Membrane traffic: exocyst III--makes a family
- Simons, K. et Zerial, M. Neuron (1993). **11**(5): 789-99. Rab proteins and the road maps for intracellular transport
- Singh, G., Raffaniello, R. D., Eng, J. et Raufman, J. P. Am J Physiol (1995). **269**(3 Pt 1): G400-7. Actions of Rab3 effector domain peptides in chief cells from guinea pig stomach
- Slembrouck, D., Annaert, W. G., Wang, J. M. et Potter, W. P. J Cell Sci (1999). **112**(Pt 5): 641-9. Rab3 is present on endosomes from bovine chromaffin cells in primary culture
- Soldati, T., Riederer, M. A. et Pfeffer, S. R. Mol Biol Cell (1993). **4**(4): 425-34. Rab GDI: a solubilizing and recycling factor for rab9 protein
- Sollner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H. et Rothman, J. E. Cell (1993a). **75**(3): 409-18. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion
- Sollner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. et Rothman, J. E. Nature (1993b). **362**(6418): 318-24. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion
- Song, H., Ming, G., Fon, E., Bellocchio, E., Edwards, R. H. et Poo, M. Neuron (1997). **18**(5): 815-26. Expression of a putative vesicular acetylcholine transporter facilitates quantal transmitter packaging
- Sontag, J. M., Aunis, D. et Bader, M. F. Eur J Cell Biol (1988). **46**(2): 316-26. Peripheral actin filaments control calcium-mediated catecholamine release from streptolysin-O-permeabilized chromaffin cells

- Sorensen, J. B., Nagy, G., Varoqueaux, F., Nehring, R. B., Brose, N., Wilson, M. C. et Neher, E. Cell(2003). **114**(1): 75-86. Differential Control of the Releasable Vesicle Pools by SNAP-25 Splice Variants and SNAP-23
- Stahl, B., Chou, J. H., Li, C., Südhof, T. C. et Jahn, R. Embo J(1996). **15**(8): 1799-809. Rab3 reversibly recruits rabphilin to synaptic vesicles by a mechanism analogous to raf recruitment by ras
- Stahl, B., von Mollard, G. F., Walch-Solimena, C. et Jahn, R. J Biol Chem(1994). **269**(40): 24770-6. GTP cleavage by the small GTP-binding protein Rab3A is associated with exocytosis of synaptic vesicles induced by alpha-latrotoxin
- Staunton, J., Ganetzky, B. et Nonet, M. L. J Neurosci(2001). **21**(23): 9255-64. Rabphilin potentiates soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor function independently of rab3
- Stegmaier, M., Yang, B., Yoo, J. S., Huang, B., Shen, M., Yu, S., Luo, Y. et Scheller, R. H. J Biol Chem(1998). **273**(51): 34171-9. Three novel proteins of the syntaxin/SNAP-25 family
- Stegmann, T. Traffic (2000). **1**(8): 598-604. Membrane fusion mechanisms: the influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion
- Stettler, O., Nothias, F., Tavitian, B. et Vernier, P. Eur J Neurosci (1995). **7**(4): 702-13. Double in situ hybridization reveals overlapping neuronal populations expressing the low molecular weight GTPases Rab3a and Rab3b in Rat brain
- Stinchcombe, J. C., Barral, D. C., Mules, E. H., Booth, S., Hume, A. N., Machesky, L. M., Seabra, M. C. et Griffiths, G. M. J Cell Biol (2001). **152**(4): 825-34. Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes
- Strom, M., Hume, A. N., Tarafder, A. K., Barkagianni, E. et Seabra, M. C. J Biol Chem(2002). **277**(28): 25423-30. A Family of Rab27-binding Proteins. MELANOPHILIN LINKS Rab27a AND MYOSIN Va FUNCTION IN MELANOSOME TRANSPORT
- Stroupe, C. et Brunger, A. T. J Mol Biol (2000). **304**(4): 585-98. Crystal structures of a Rab protein in its inactive and active conformations
- Su, Y. C., Kao, L. S., Chu, Y. Y., Liang, Y., Tsai, M. H. et Chern, Y. Biochem Biophys Res Commun (1994). **200**(3): 1257-63. Distribution and regulation of rab3C, a small molecular weight GTP- binding protein
- Sugita, S., Shin, O. H., Han, W., Lao, Y. et Südhof, T. C. Embo J(2002). **21**(3): 270-80. Synaptotagmins form a hierarchy of exocytotic Ca(2+) sensors with distinct Ca(2+) affinities
- Sulzer, D., Chen, T. K., Lau, Y. Y., Kristensen, H., Rayport, S. et Ewing, A. J Neurosci(1995). **15**(5 Pt 2): 4102-8. Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport
- Sulzer, D. et Pothos, E. N. Rev Neurosci (2000). **11**(2-3): 159-212. Regulation of quantal size by presynaptic mechanisms
- Sun, L., Bittner, M. A. et Holz, R. W. J Biol Chem (2001). **276**(16): 12911-7. Rab3a binding and secretion-enhancing domains in Rim1 are separate and unique. Studies in adrenal chromaffin cells
- Sunshine, C., Francis, S. et Kirk, K. L. Exp Cell Res (2000). **257**(1): 1-10. Rab3B regulates ZO-1 targeting and actin organization in PC12 neuroendocrine cells
- Sutton, R. B., Davletov, B. A., Berghuis, A. M., Südhof, T. C. et Sprang, S. R. Cell(1995). **80**(6): 929-38. Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca2+/phospholipid-binding fold
- Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R. et Brunger, A. T. Nature(1998). **395**(6700): 347-53. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution
- Suzuki, N., Hirono, M., Takagi, H. et Yoshioka, T. Biochem Biophys Res Commun (1997). **235**(2): 331-5. Facilitation of Ca2+ action potential frequency by a small G protein Rab3A in rat pituitary GH3 cells
- Sweitzer, S. M. et Hinshaw, J. E. Cell(1998). **93**(6): 1021-9. Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation
- Tahara, M., Coorssen, J. R., Timmers, K., Blank, P. S., Whalley, T., Scheller, R. et Zimmerberg, J. J Biol Chem (1998). **273**(50): 33667-73. Calcium can disrupt the SNARE protein complex on sea urchin egg secretory vesicles without irreversibly blocking fusion
- Takahashi, N., Miner, L. L., Sora, I., Ujike, H., Revay, R. S., Kostic, V., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S. et Uhl, G. R. Proc Natl Acad Sci U S A (1997). **94**(18): 9938-43. VMAT2 knockout mice: heterozygotes display reduced amphetamine-conditioned reward, enhanced amphetamine locomotion, and enhanced MPTP toxicity

- Tanaka, M., Miyoshi, J., Ishizaki, H., Togawa, A., Ohnishi, K., Endo, K., Matsubara, K., Mizoguchi, A., Nagano, T., Sato, M., Sasaki, T. et Takai, Y. Mol Biol Cell (2001). **12**(5): 1421-30. Role of Rab3 GDP/GTP exchange protein in synaptic vesicle trafficking at the mouse neuromuscular junction
- Tasaka, K., Masumoto, N., Mizuki, J., Ikebuchi, Y., Ohmichi, M., Kurachi, H., Miyake, A. et Murata, Y. J Endocrinol (1998). **157**(2): 267-74. Rab3B is essential for GnRH-induced gonadotrophin release from anterior pituitary cells
- TerBush, D. R., Maurice, T., Roth, D. et Novick, P. Embo J (1996). **15**(23): 6483-94. The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*
- Touchot, N., Chardin, P. et Tavitian, A. Proc Natl Acad Sci U S A (1987). **84**(23): 8210-4. Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library
- Travis, E. R., Wang, Y. M., Michael, D. J., Caron, M. G. et Wightman, R. M. Proc Natl Acad Sci U S A (2000). **97**(1): 162-7. Differential quantal release of histamine and 5-hydroxytryptamine from mast cells of vesicular monoamine transporter 2 knockout mice
- Trifaro, J., Rose, S. D., Lejen, T. et Elzagallaai, A. Biochimie (2000). **82**(4): 339-52. Two pathways control chromaffin cell cortical F-actin dynamics during exocytosis
- Tuvim, M. J., Adachi, R., Chocano, J. F., Moore, R. H., Lampert, R. M., Zera, E., Romero, E., Knoll, B. J. et Dickey, B. F. Am J Respir Cell Mol Biol (1999). **20**(1): 79-89. Rab3D, a small GTPase, is localized on mast cell secretory granules and translocates to the plasma membrane upon exocytosis
- Ubach, J., Garcia, J., Nittler, M. P., Südhof, T. C. et Rizo, J. Nat Cell Biol (1999). **1**(2): 106-12. Structure of the janus-faced C2B domain of rabphilin
- Ubach, J., Zhang, X., Shao, X., Südhof, T. C. et Rizo, J. Embo J (1998). **17**(14): 3921-30. Ca²⁺ binding to synaptotagmin: how many Ca²⁺ ions bind to the tip of a C2-domain?
- Ullrich, O., Stenmark, H., Alexandrov, K., Huber, L. A., Kaibuchi, K., Sasaki, T., Takai, Y. et Zerial, M. J Biol Chem (1993). **268**(24): 18143-50. Rab GDP dissociation inhibitor as a general regulator for the membrane association of rab proteins
- Ungermann, C., Sato, K. et Wickner, W. Nature (1998). **396**(6711): 543-8. Defining the functions of trans-SNARE pairs
- Uphues, I., Chern, Y. et Eckel, J. FEBS Lett (1995). **377**(2): 109-12. Insulin-dependent translocation of the small GTP-binding protein rab3C in cardiac muscle: studies on insulin-resistant Zucker rats
- Vadlamudi, R. K., Wang, R. A., Talukder, A. H., Adam, L., Johnson, R. et Kumar, R. Mol Cell Biol (2000). **20**(23): 9092-101. Evidence of Rab3A expression, regulation of vesicle trafficking, and cellular secretion in response to heregulin in mammary epithelial cells
- Valentijn, J. A., Sengupta, D., Gumkowski, F. D., Tang, L. H., Konieczko, E. M. et Jamieson, J. D. Eur J Cell Biol (1996). **70**(1): 33-41. Rab3D localizes to secretory granules in rat pancreatic acinar cells
- van, I. S. C., Tuvim, M. J., Weimbs, T., Dickey, B. F. et Mostov, K. E. Dev Cell (2002). **2**(2): 219-28. Direct interaction between Rab3b and the polymeric immunoglobulin receptor controls ligand-stimulated transcytosis in epithelial cells
- Verhage, M., Hens, J. J., De Grann, P. N., Boomsma, F., Wiegant, V. M., da Silva, F. H., Gispen, W. H. et Ghijsen, W. E. Eur J Pharmacol (1995). **291**(3): 387-98. Ba²⁺ replaces Ca²⁺/calmodulin in the activation of protein phosphatases and in exocytosis of all major transmitters
- Videen, J. S., Mezger, M. S., Chang, Y. M. et O'Connor, D. T. J Biol Chem (1992). **267**(5): 3066-73. Calcium and catecholamine interactions with adrenal chromogranins. Comparison of driving forces in binding and aggregation
- Vitale, M. L., Rodriguez Del Castillo, A., Tchakarov, L. et Trifaro, J. M. J Cell Biol (1991). **113**(5): 1057-67. Cortical filamentous actin disassembly and scinderin redistribution during chromaffin cell stimulation precede exocytosis, a phenomenon not exhibited by gelsolin
- Vitale, N., Caumont, A. S., Chasserot-Golaz, S., Du, G., Wu, S., Sciorra, V. A., Morris, A. J., Frohman, M. A. et Bader, M. F. Embo J (2001). **20**(10): 2424-34. Phospholipase D1: a key factor for the exocytotic machinery in neuroendocrine cells
- Voets, T. Neuron (2000). **28**(2): 537-45. Dissection of three Ca²⁺-dependent steps leading to secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices
- Voets, T., Moser, T., Lund, P. E., Chow, R. H., Geppert, M., Südhof, T. C. et Neher, E. Proc Natl Acad Sci U S A (2001a). **98**(20): 11680-5. Intracellular calcium dependence of large dense-core vesicle exocytosis in the absence of synaptotagmin I

- Voets, T., Neher, E. et Moser, T. Neuron (1999). **23**(3): 607-15. Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices
- Voets, T., Toonen, R. F., Brian, E. C., de Wit, H., Moser, T., Rettig, J., Sudhof, T. C., Neher, E. et Verhage, M. Neuron (2001b). **31**(4): 581-91. Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking
- von Gersdorff, H., Vardi, E., Matthews, G. et Sterling, P. Neuron (1996). **16**(6): 1221-7. Evidence that vesicles on the synaptic ribbon of retinal bipolar neurons can be rapidly released
- von Mollard, G. F., Nothwehr, S. F. et Stevens, T. H. J Cell Biol (1997). **137**(7): 1511-24. The yeast v-SNARE Vti1p mediates two vesicle transport pathways through interactions with the t-SNAREs Sed5p and Pep12p
- Von Ruden, L., Garcia, A. G. et Lopez, M. G. Febs Letters (1993). **336**(1): 48-52. The Mechanism of Ba²⁺-Induced Exocytosis from Single Chromaffin Cells
- Wada, M., Nakanishi, H., Satoh, A., Hirano, H., Obaishi, H., Matsuura, Y. et Takai, Y. J Biol Chem (1997). **272**(7): 3875-8. Isolation and characterization of a GDP/GTP exchange protein specific for the Rab3 subfamily small G proteins
- Walch-Solimena, C., Blasi, J., Edelmann, L., Chapman, E. R., von Mollard, G. F. et Jahn, R. J Cell Biol (1995). **128**(4): 637-45. The t-SNAREs syntaxin 1 and SNAP-25 are present on organelles that participate in synaptic vesicle recycling
- Wang, J., Takeuchi, T., Yokota, H. et Izumi, T. J Biol Chem (1999). **274**(40): 28542-8. Novel rabphilin-3-like protein associates with insulin-containing granules in pancreatic beta cells
- Wang, X., Hu, B., Zimmermann, B. et Kilimann, M. W. J Biol Chem (2001). **276**(35): 32480-8. Rim1 and rabphilin-3 bind Rab3-GTP by composite determinants partially related through N-terminal alpha-helix motifs
- Wang, Y., Okamoto, M., Schmitz, F., Hofmann, K. et Sudhof, T. C. Nature (1997a). **388**(6642): 593-8. Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion
- Wang, Y., Sugita, S. et Sudhof, T. C. J Biol Chem (2000). **275**(26): 20033-44. The RIM/NIM family of neuronal C2 domain proteins. Interactions with Rab3 and a new class of Src homology 3 domain proteins
- Wang, Y. M., Gainetdinov, R. R., Fumagalli, F., Xu, F., Jones, S. R., Bock, C. B., Miller, G. W., Wightman, R. M. et Caron, M. G. Neuron (1997b). **19**(6): 1285-96. Knockout of the vesicular monoamine transporter 2 gene results in neonatal death and supersensitivity to cocaine and amphetamine
- Washbourne, P., Thompson, P. M., Carta, M., Costa, E. T., Mathews, J. R., Lopez-Bendito, G., Molnar, Z., Becher, M. W., Valenzuela, C. F., Partridge, L. D. et Wilson, M. C. Nat Neurosci (2002). **5**(1): 19-26. Genetic ablation of the t-SNARE SNAP-25 distinguishes mechanisms of neuroexocytosis
- Weatherspoon, J. K. et Werling, L. L. J Pharmacol Exp Ther (1999). **289**(1): 278-84. Modulation of amphetamine-stimulated [³H]dopamine release from rat pheochromocytoma (PC12) cells by sigma type 2 receptors
- Weber, E., Berta, G., Tousson, A., St John, P., Green, M. W., Gopalakrishnan, U., Jilling, T., Sorscher, E. J., Elton, T. S., Abrahamson, D. R. et al. J Cell Biol (1994). **125**(3): 583-94. Expression and polarized targeting of a rab3 isoform in epithelial cells
- Weber, E., Jilling, T. et Kirk, K. L. J Biol Chem (1996). **271**(12): 6963-71. Distinct functional properties of Rab3A and Rab3B in PC12 neuroendocrine cells
- Weber, T., Parlati, F., McNew, J. A., Johnston, R. J., Westermann, B., Sollner, T. H. et Rothman, J. E. J Cell Biol (2000). **149**(5): 1063-72. SNAREpins are functionally resistant to disruption by NSF and alphaSNAP
- Weber, T., Zemelman, B. V., McNew, J. A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Sollner, T. H. et Rothman, J. E. Cell (1998). **92**(6): 759-72. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion
- Wick, P. F., Senter, R. A., Parsels, L. A., Uhler, M. D. et Holz, R. W. J Biol Chem (1993). **268**(15): 10983-9. Transient transfection studies of secretion in bovine chromaffin cells and PC12 cells. Generation of kainate-sensitive chromaffin cells
- Wilson, A. L., Erdman, R. A. et Maltese, W. A. J Biol Chem (1996). **271**(18): 10932-40. Association of Rab1B with GDP-dissociation inhibitor (GDI) is required for recycling but not initial membrane targeting of the Rab protein
- Wilson, S. M., Yip, R., Swing, D. A., O'Sullivan, T. N., Zhang, Y., Novak, E. K., Swank, R. T., Russell, L. B., Copeland, N. G. et Jenkins, N. A. Proc Natl Acad Sci U S A (2000). **97**(14): 7933-8. A mutation in Rab27a causes the vesicle transport defects observed in ashen mice

- Wu, X., Rao, K., Bowers, M. B., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. et Hammer, J. A., 3rd J Cell Sci (2001). **114**(Pt 6): 1091-100. Rab27a enables myosin Va-dependent melanosome capture by recruiting the myosin to the organelle
- Wu, X. S., Rao, K., Zhang, H., Wang, F., Sellers, J. R., Matesic, L. E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. et Hammer, J. A., 3rd Nat Cell Biol (2002). **4**: 4. Identification of an organelle receptor for myosin-Va
- Wu, Y., He, Y., Bai, J., Ji, S. R., Tucker, W. C., Chapman, E. R. et Sui, S. F. Proc Natl Acad Sci U S A (2003). **100**(4): 2082-7. Visualization of synaptotagmin I oligomers assembled onto lipid monolayers
- Xiao, G. H., Shoarinejad, F., Jin, F., Golemis, E. A. et Yeung, R. S. J Biol Chem (1997). **272**(10): 6097-100. The tuberous sclerosis 2 gene product, tuberin, functions as a Rab5 GTPase activating protein (GAP) in modulating endocytosis
- Xu, T., Binz, T., Niemann, H. et Neher, E. Nat Neurosci (1998). **1**(3): 192-200. Multiple kinetic components of exocytosis distinguished by neurotoxin sensitivity
- Xu, T., Rammner, B., Margittai, M., Artalejo, A. R., Neher, E. et Jahn, R. Cell (1999). **99**(7): 713-22. Inhibition of SNARE complex assembly differentially affects kinetic components of exocytosis
- Yamamoto, O. et Bhawan, J. Pigment Cell Res (1994). **7**(3): 158-69. Three modes of melanosome transfers in Caucasian facial skin: hypothesis based on an ultrastructural study
- Yang, B., Gonzalez, L., Jr., Prekeris, R., Steegmaier, M., Advani, R. J. et Scheller, R. H. J Biol Chem (1999). **274**(9): 5649-53. SNARE interactions are not selective. Implications for membrane fusion specificity
- Yang, C., Slepnev, V. I. et Goud, B. J Biol Chem (1994). **269**(50): 31891-9. Rab proteins form in vivo complexes with two isoforms of the GDP- dissociation inhibitor protein (GDI)
- Ybe, J. A., Wakeham, D. E., Brodsky, F. M. et Hwang, P. K. Traffic (2000). **1**(6): 474-9. Molecular structures of proteins involved in vesicle fusion
- Yi, Z., Yokota, H., Torii, S., Aoki, T., Hosaka, M., Zhao, S., Takata, K., Takeuchi, T. et Izumi, T. Mol Cell Biol (2002). **22**(6): 1858-67. The rab27a/granuphilin complex regulates the exocytosis of insulin- containing dense-core granules
- Yoshihara, M. et Littleton, J. T. Neuron (2002). **36**(5): 897-908. Synaptotagmin I functions as a calcium sensor to synchronize neurotransmitter release
- Youdim, M. B., Heldman, E., Pollard, H. B., Fleming, P. et McHugh, E. Neuroscience (1986). **19**(4): 1311-8. Contrasting monoamine oxidase activity and tyramine induced catecholamine release in PC12 and chromaffin cells
- Yunes, R., Michaut, M., Tomes, C. et Mayorga, L. S. Biol Reprod (2000). **62**(4): 1084-9. Rab3A triggers the acrosome reaction in permeabilized human spermatozoa
- Yunes, R., Tomes, C., Michaut, M., De Blas, G., Rodriguez, F., Regazzi, R. et Mayorga, L. S. FEBS Lett (2002). **525**(1-3): 126-30. Rab3A and calmodulin regulate acrosomal exocytosis by mechanisms that do not require a direct interaction
- Zachor, D. A., Moore, J. F., Brezausek, C., Theibert, A. et Percy, A. K. Brain Res (2000). **869**(1-2): 85-97. Cocaine inhibits NGF-induced PC12 cells differentiation through D(1)- type dopamine receptors
- Zahraoui, A., Touchot, N., Chardin, P. et Tavittian, A. Nucleic Acids Res (1988). **16**(3): 1204. Complete coding sequences of the ras related rab 3 and 4 cDNAs
- Zerial, M. et McBride, H. Nat Rev Mol Cell Biol (2001). **2**(2): 107-17. Rab proteins as membrane organizers
- Zhang, B., Koh, Y. H., Beckstead, R. B., Budnik, V., Ganetzky, B. et Bellen, H. J. Neuron (1998). **21**(6): 1465-75. Synaptic vesicle size and number are regulated by a clathrin adaptor protein required for endocytosis
- Zhang, H., Seabra, M. C. et Deisenhofer, J. Structure Fold Des (2000). **8**(3): 241-51. Crystal structure of Rab geranylgeranyltransferase at 2.0 A resolution
- Zhang, J. Z., Davletov, B. A., Sudhof, T. C. et Anderson, R. G. Cell (1994). **78**(5): 751-60. Synaptotagmin I is a high affinity receptor for clathrin AP-2: implications for membrane recycling
- Zhao, S., Torii, S., Yokota-Hashimoto, H., Takeuchi, T. et Izumi, T. Endocrinology (2002). **143**(5): 1817-24. Involvement of Rab27b in the regulated secretion of pituitary hormones
- Zhou, Q., Petersen, C. C. et Nicoll, R. A. J Physiol (2000). **525 Pt 1**: 195-206. Effects of reduced vesicular filling on synaptic transmission in rat hippocampal neurones

Zhu, G., Liu, J., Terzyan, S., Zhai, P., Li, G. et Zhang, X. C. J Biol Chem (2003). **278**(4): 2452-60. High resolution crystal structures of human Rab5a and five mutants with substitutions in the catalytically important phosphate-binding loop

Zimmerberg, J., Blank, P. S., Kolosova, I., Cho, M. S., Tahara, M. et Coorsen, J. R. Biochimie (2000). **82**(4): 303-314. A stage-specific preparation to study the Ca²⁺-triggered fusion steps of exocytosis: Rationale and perspectives