

N° d'ordre : 3267

# THÈSE

pour le

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I

École Doctorale « Sciences du vivant, Géosciences et Sciences de  
l'Environnement »

SPÉCIALITÉ : **Biologie Moléculaire et Cellulaire**

par

**Florence GRISE**

### **Recherche des senseurs calciques de la sécrétion d'insuline dans les cellules $\beta$ -pancréatiques : Étude des synaptotagmines**

Soutenue le : 4 décembre 2006

**Après avis de :**

M. Oliver NÜSSE, Professeur, Université Paris-Sud 11

M. Marc LANDRY, Professeur, Université Bordeaux 2

**Devant la commission d'examen formée de :**

Mme Véronique PALLET, Professeur, Université Bordeaux 1

Mme Agnès HEMAR, Chargée de recherche, CNRS

M. Oliver NÜSSE, Professeur, Université Paris-Sud 11

M. Marc LANDRY, Professeur, Université Bordeaux 2

M. Jean-Jacques BRUSTIS, Professeur, Université Bordeaux 1

M. Jochen LANG, Professeur, Université Bordeaux 1

**Présidente**

**Examinatrice**

**Rapporteur**

**Rapporteur**

**Examineur**

**Directeur de thèse**



Ce travail a été réalisé au laboratoire de Dynamique Moléculaire et Protéomique Fonctionnelle des Cellules Sécrétoires, au sein de l'Institut Européen de Chimie et de Biologie de Bordeaux.

Je tiens à remercier Jochen Lang de m'avoir permis de réaliser cette thèse en m'accueillant dans son laboratoire.

Je remercie Oliver Nüsse et Marc Landry d'avoir accepté de juger mon travail, et Véronique Pallet, Agnès Hémar et Jean-Jacques Brustis d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je remercie particulièrement Valérie Lagrée pour ses conseils, son soutien et sa gentillesse qui m'ont aidé pendant ces trois ans.

Je remercie également, Alexandra Milochau et Marie-Noëlle Benassy avec qui cela a été un réel plaisir de travailler pendant trois ans. Je remercie aussi, toutes les personnes du laboratoire, Julien Papin, Mathilde Dubois, Pier Scotti, Benoît Roger et Gilles Charpentier pour leur soutien et leurs conseils, ainsi que la bonne humeur qu'ils apportent au laboratoire.

Un grand merci à William et à ma famille, qui ont toujours cru en moi et pour leur soutien sans faille.



# **SOMMAIRE**



<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>I. Physiologie de la sécrétion d'insuline .....</b>	<b>2</b>
A. Homéostasie du glucose et régulation de la glycémie.....	2
1. Homéostasie du glucose .....	2
2. Régulation de la glycémie .....	2
B. Pancréas.....	4
C. La cellule $\beta$ et la sécrétion régulée d'insuline.....	6
1. Deux types de sécrétion : régulée et constitutive .....	6
2. Transport et métabolisme du glucose dans les cellules $\beta$ .....	7
3. Les flux ioniques et la sécrétion d'insuline .....	9
4. Effets indirects du glucose sur la sécrétion: effets distaux du glucose .....	11
5. La sécrétion biphasique de l'insuline .....	12
6. Les régulateurs de la sécrétion d'insuline .....	16
7. Dérégulation de l'homéostasie du glucose : Diabète sucré.....	20
<b>II. Les aspects moléculaires de la sécrétion d'insuline.....</b>	<b>16</b>
A. Biosynthèse et maturation de l'insuline .....	22
1. Transcription du gène et traduction de la préproinsuline.....	22
2. Maturation des vésicules et adressage de la protéine .....	23
B. Les vésicules du transport post-golgien dans la cellule $\beta$ .....	23
1. Les vésicules du transport constitutif.....	24
2. Les microvésicules de type synaptique (SLMV) .....	24
3. Les vésicules d'endocytose .....	24
4. Les granules sécrétoires ou vésicules larges à cœur dense (LDCV).....	26
C. Les événements menant à la fusion régulée à la membrane plasmique .....	26
1. Accrochage des vésicules ( <i>tethering</i> ).....	27
2. Amarrage des vésicules ( <i>docking</i> ).....	27
3. Fixation des vésicules ( <i>priming</i> ) .....	28
D. La fusion membranaire.....	29
1. Fusion complète ou incomplète.....	29
2. Le pore de fusion : lipidique ou protéique ?.....	30
E. Les acteurs moléculaires de la fusion membranaire.....	31
1. Le complexe SNARE .....	31
2. Implication du complexe SNARE dans la fusion membranaire .....	35
3. Les régulateurs du complexe SNARE et de la fusion .....	36
4. Le calcium et les senseurs calciques .....	40
<b>III. Le calcium : un second messager intracellulaire.....</b>	<b>41</b>
A. Le calcium .....	41
1. Méthodes d'étude de l'implication du calcium dans les processus physiologiques .....	41
2. Le calcium : un second messager particulier .....	42
B. La signalisation calcique intracellulaire .....	43
1. La création du signal calcique .....	43
2. La médiation du signal calcique : les senseurs calciques.....	46

<b>IV. Les Synaptotagmines.....</b>	<b>49</b>
A. La grande famille des Synaptotagmines.....	50
1. Structure générale de Syt 1.....	50
2. Comparaison génétique des synaptotagmines.....	53
3. Classification et caractéristiques des différentes isoformes.....	54
B. Interactions fonctionnelles de Syt 1 .....	60
1. Interaction avec les phospholipides membranaires.....	60
2. Interaction avec les protéines du complexe SNARE .....	64
C. Interactions structurales de Syt 1 .....	68
1. Liaison de Syt 1 aux canaux calciques dépendants du voltage.....	68
2. Oligomérisation dépendante du calcium.....	69
D. Syt 1 : senseur calcique de la transmission synaptique.....	70
1. Rôle de Syt 1 dans les étapes préfusionnelles des vésicules.....	71
2. Fonctions de Syt 1 dans la fusion des vésicules présynaptiques.....	71
3. Effet régulateur de Syt 1 sur la dynamique d'ouverture du pore de fusion .....	75
4. Rôle de Syt 1 dans l'endocytose des vésicules de sécrétion .....	76
E. La redondance fonctionnelle des Syt .....	77
F. La synaptotagmine 9 .....	78
1. Expression tissulaire et localisation cellulaire .....	79
2. Propriétés biochimiques spécifiques des domaines C2 de Syt 9.....	79
3. Rôles physiologiques de Syt 9 dans les cellules $\beta$ et dans d'autres types cellulaires... .....	81
<b>Objectifs de l'étude.....</b>	<b>84</b>
<b>Résultats Partie I.....</b>	<b>86</b>
<b>Résultats Partie II.....</b>	<b>109</b>
<b>Résultats Partie III.....</b>	<b>120</b>
<b>Résultats Partie IV.....</b>	<b>153</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>153</b>
<b>I. Etude de la fonction de Syt 9 par inhibition de son expression par ARN interférence dans les lignées HIT-T15 et MIN6.....</b>	<b>155</b>
A. Diminution de l'expression de Syt 9 par l'utilisation de siRNA dans les lignées cellulaires HIT-T15 et MIN6 .....	155
B. Effet du siRNA Syt 9 sur la quantité intracellulaire d'hormone et la sécrétion stimulée par dépolarisation.....	156
C. Implication de Syt 9 dans le trafic vésiculaire des granules de sécrétion .....	157
<b>II. Etude de la fonction de Syt 9 dans la lignée INS-1E par ARN interférence.....</b>	<b>159</b>



<b>III. Implication des domaines C2 dans la fonction de Syt 9 par expression de protéines mutées .....</b>	<b>161</b>
<b>Discussion.....</b>	<b>163</b>
<b>Conclusions et Perspectives.....</b>	<b>166</b>
<b>Matériel et Méthodes.....</b>	<b>172</b>
<b>I. Matériel Biologique .....</b>	<b>172</b>
A. Souches Bactériennes.....	172
B. Lignées cellulaires.....	172
C. Vecteurs de clonage .....	173
D. Anticorps .....	173
<b>II. Milieux et conditions de culture .....</b>	<b>174</b>
A. Bactéries.....	174
1. Milieu pour culture de bactéries.....	174
2. Conditions de culture et de conservation des bactéries.....	174
B. Cellules de mammifères .....	174
1. Milieux pour la culture des cellules de mammifères.....	174
2. Conditions de culture et de conservation des cellules de mammifères.....	175
<b>III. Biologie moléculaire .....</b>	<b>177</b>
A. Digestion et ligation des ADN .....	177
1. Digestion de l'ADN .....	177
2. Ligation de l'ADN .....	177
B. Amplification d'une séquence par PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ) .....	177
C. Séparation et purification des acides nucléiques par électrophorèse .....	178
1. Migration des acides nucléiques .....	178
2. Extraction des acides nucléiques à partir d'un gel d'agarose.....	179
D. Transformation des bactéries E.coli compétentes .....	179
1. Préparation des bactéries compétentes.....	179
2. Transformation des bactéries .....	180
E. Extraction d'ADN plasmidique à partir de cultures bactériennes.....	180
F. Mutagenèse dirigée .....	181
G. Séquençage de l'ADN.....	181
1. Réaction de séquençage .....	181
2. Précipitation de l'ADN.....	181
H. Méthodes d'expression des ARN interférence (siRNA).....	182

<b>IV. Biochimie .....</b>	<b>183</b>
A. Préparation des extraits cellulaires et tissulaires .....	183
1. Préparation d'homogénats de lignée cellulaire de mammifères.....	183
2. Préparation de surnageants post-nucléaire .....	183
3. Préparation des synaptosomes.....	184
B. Analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes.....	184
1. Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide .....	184
2. Visualisation des protéines sur gels .....	185
C. Electrotransfert et immunodétection : Western-blot .....	185
1. Transfert semi-sec sur membrane de PVDF .....	185
2. Immunodétection (ou immunoblot) .....	185
D. Dosage des protéines .....	186
1. Dosage des protéines en solution .....	186
2. Dosage des protéines sur gel .....	186
E. Test <i>in vitro</i> de translocation biochimique aux membranes.....	186
<b>V. Biologie cellulaire.....</b>	<b>188</b>
A. Transfection des cellules de mammifères .....	188
1. Plaque de 24 puits .....	188
2. Boîte de Pétri 35 mm.....	188
B. Immunofluorescence .....	189
<b>VI. Analyses fonctionnelles des lignées cellulaires.....</b>	<b>191</b>
A. Sécrétion stimulée d'hormone de croissance .....	191
1. Transfection transitoire .....	191
2. Incubation statique .....	191
3. Traitement à la streptolysine-O .....	193
B. Dosage ELISA.....	194
C. Vidéomicroscopie.....	194
<b>Références Bibliographiques.....</b>	<b>208</b>

# **ABBREVIATIONS**



**AC** : Adénylate cyclase  
**ACh** : Acétylcholine  
**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**ADNc** : ADN complémentaire  
**ADP** : Adénosine diphosphate  
**AMPC** : Adénosine monophosphate cyclique  
**AP** : Protéine adaptatrice  
**ARN** : Acide ribonucléique  
**ARNm** : ARN messenger  
**ATP** : Adénosine triphosphate  
**BSA** : Albumine sérique bovine  
**Ca<sup>2+</sup>** : Calcium  
**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>** : Concentration intracellulaire en calcium libre  
**CREB** : cAMP response element binding protein  
**Csp** : Cysteine-string protein  
**DAG** : Diacylglycérol  
**DHP** : Dihydropyridines  
**DMSO** : Diméthylsulfoxyde  
**dNTPs** : Désoxy-nucléotide tri-phosphate  
**ddNTPs** : Didésoxy-nucléotide tri-phosphate  
**DO** : Densité optique  
**DTM (ou TM)** : Domaine transmembranaire  
**EDTA** : Acide éthylènediamine tétraacétique  
**ELISA** : *Enzyme-linked immunosorbent assay*  
**EGTA** : Acide éthylène glycol-bis(β-aminoéthyléther) N,N,N',N'-Tetraacétique  
**FITC** : Fluoresceine isothiocyanate  
**FRET** : *Fluorescence resonance energy transfert*  
**G6P** : Glucose-6-phosphate  
**GABA** : Acide gamma-aminobutyrique  
**GAD** : L-glutamic aciddecarboxylase  
**GAP** : *GTPase-activating protein*  
**GDI** : *GDP-dissociation inhibitor*  
**GDP** : Guanosine diphosphate  
**GFP** : *Green fluorescent protein*

**GK** : Glucokinase  
**GLP-1** : *Glucagon-like peptide*  
**GLUT** : *Glucose transporter*  
**GPCR** : récepteur couplé aux protéines G (*G-proteins coupled receptors*)  
**GPDHm** : Glycérol phosphate déshydrogénase mitochondriale  
**GST** : Glutathion-S-transférase  
**GTP** : Guanosine triphosphate  
**HCSP** : *Highly calcium-sensitive pool*  
**HEDTA** : Acide hydroxyéthylènediamine tétraacétique  
**HEPES** : Acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineéthanesulfonic  
**hGH** : hormone de croissance humaine (*human Hormone growth factor*)  
**HRP** : *Horseradish peroxydase*  
**IBMX** : Isobutyl-méthylxanthine  
**IP<sub>3</sub>** : Inositol-(1,4,5)-triphosphate  
**IP<sub>4</sub>** : Inositol-4-triphosphate  
**IPTG** : Isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside  
**IRS1/2** : *Insulin receptor substrate1/2*  
**ISG** : Granules sécrétoires immatures  
**K<sub>ATP</sub>** : Canaux potassiques ATP-dépendants  
**K<sub>M</sub>** : Constante de Michaelis  
**KRB** : *Krebs-Ringer-HEPES buffer*  
**LB** : Luria Bertani  
**VLCD (ou LDCV)** : Vésicules larges à cœur dense (*Large dense core vesicle*)  
**LDH** : Lactate deshydrogénase  
**Mito** : Mitochondrie  
**MP (ou PM)** : Membrane plasmique (*plasma membrane*)  
**Munc-18** : *Mammalian uncoordinated-18*  
**m/v** : Masse /volume  
**NADH** : Nicotinamide adénine dinucléotide  
**NEM** : *N-ethylmaleimide-sensitive factor*  
**NSF** : *NEM-sensitive factor*  
**NTA** : Acide nitrilotriacétique  
**PBS** : *phosphate buffer salin*  
**PDX-1** : *Pancreatic duodenal homeobox 1*

**PC** : *Proinsulin conversion endoprotease*

**PC** : Phosphatidylcholine

**PCR** : *Polymerase chain reaction*

**PFA** : Paraformaldéhyde

**PI** : Proinsuline

**PI(4,5)P<sub>2</sub> ou PIP<sub>2</sub>** : Phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphate

**PI(3,4,5)P<sub>3</sub>** : Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate

**PI3K** : Phosphatidylinositol-3-phosphate kinase

**PKA** : Protéine kinase AMP cyclique dépendante

**PKC** : Protéine kinase calcium dépendante

**PLC** : Phospholipase C

**PMA** : Phorbol-myristate-acétate

**PPI** : Pré-proinsuline

**PS** : Phosphatidylsérine

**PVDF** : Polyvinylidène difluoride

**RBL** : *Rat basophilic leukaemia*

**RE** : Réticulum endoplasmique

**RMN** : Résonance magnétique nucléaire

**RP** : *Reserve pool*

**RRP** : *Readily releasable pool*

**RTnf** : Récepteur de la transferrine

**SDS** : Sodium dodécyl sulfate

**SERCA** : *Sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase*

**SiRNA** : *Small interfering RNA*

**SLMV** : Microvésicules de type synaptique (*synaptic-like microvesicle*)

**SNAP** : *Soluble NSF-attachment protein*

**SNARE** : *Soluble NSF-attachment protein receptor*

**SNAP-25** : *Synaptosomal-associated protein of 25 kDa*

**SRP** : *Slowly releasable pool*

**Syt** : Synaptotagmine

**TAE** : TRIS, Acétate, EDTA

**TBE** : TRIS, Borate, EDTA

**TBS-T** : *Tris buffer saline Tween*

**TEMED** : N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine; N,N,N',N'-Di(diméthylamino)ethane;  
N,N,N',N'-Tetraméthyl-1,2-diaminométhane

**TGN** : Réseau trans Golgien (*trans golgi network*)

**TRIS** : Tris-(hydroxyméthyl) aminométhane

**TRITC** : Tétraméthylrhodamine

**VAMP** : *Vesicle-associated membrane protein*

**VDCC (ou CCDV)** : *Voltage-dependant calcium channel* (Canaux calciques voltage-dépendants)

**VGAT** : *Vesicular GABA transporter*

**VGF** : non-acronymique

**VSVG** : *vesicular stomatitis virus G protein*

**v/v** : Volume/volume



# **INTRODUCTION**



En réponse à une augmentation de la glycémie, les vésicules sécrétoires contenant l'insuline dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques se rapprochent de la membrane plasmique et les membranes vésiculaire et plasmique fusionnent, libérant l'insuline. Ce processus s'appelle l'exocytose. Il existe deux types majeurs d'exocytose : l'exocytose constitutive et l'exocytose régulée. Dans le cas de la libération d'hormones ou de neurotransmetteurs, les neurones, les cellules neuro-endocrines (comme les cellules chromaffines de la glande surrénale) et endocrines (comme les cellules  $\beta$ -pancréatiques) mettent en place une exocytose régulée stimulée par le calcium. L'étude de l'exocytose régulée dans les neurones a permis de faire avancer les connaissances sur les mécanismes de la fusion membranaire. Par analogie, la libération d'insuline dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques constitue aussi un bon modèle d'étude de l'exocytose régulée. La compréhension des mécanismes de libération de l'hormone permettrait également de grandes avancées dans l'étude de la pathologie du diabète de type 2. En effet, dans cette maladie, les cellules  $\beta$  présentent un défaut de sécrétion de l'insuline et les tissus cibles deviennent résistants à l'hormone.

Plusieurs étapes du trafic vésiculaire et de l'exocytose sont régulées par le calcium. Dans les cellules endocrines, neuroendocrines et les neurones, les variations de la concentration calcique intracellulaire sont détectées par les synaptotagmines. Ces protéines transmembranaires sont connues pour être des senseurs calciques et leurs propriétés biochimiques laissent entrevoir un rôle crucial dans le mécanisme de fusion membranaire.

Dans la partie introductive de ce mémoire, je détaillerai dans un premier temps la physiologie de la libération d'insuline dans les cellules  $\beta$ , puis les mécanismes moléculaires de l'exocytose régulée par le calcium. La troisième partie concernera l'importance d'un signal calcique dans la signalisation cellulaire, et enfin, j'introduirai la notion de senseur calcique par une étude approfondie des synaptotagmines et de leur implication dans la fusion membranaire régulée.

## **I. PHYSIOLOGIE DE LA SECRETION D'INSULINE**

### **A. Homéostasie du glucose et régulation de la glycémie**

#### **1. Homéostasie du glucose**

Le glucose est une source d'énergie nécessaire pour l'organisme et son apport est variable dans le temps. Néanmoins, le taux de glucose sanguin (ou glycémie) doit être maintenu constant, compris entre 3 et 10 mM (glycémie moyenne à jeun de 5 mM) (Schuit et al., 2002; Thorens, 2003a), afin d'éviter les périodes d'hypoglycémie et d'hyperglycémie. En effet, suite à de fréquentes périodes de forte glycémie, des lésions d'athérosclérose peuvent apparaître sur les parois des artères, augmentant les risques d'infarctus (Mankovsky and Ziegler, 2004). De même, les lésions des petits vaisseaux entraînent des rétinopathies et néphropathies qui peuvent conduire à la cécité et à une insuffisance rénale. Dans le but d'éviter des pics d'hyperglycémie et d'hypoglycémie, qui provoquent des malaises, l'organisme a mis en place un système de régulation très fin de la glycémie. Cette régulation met en jeu plusieurs hormones qui modifient le stockage du glucose, sa mobilisation et son utilisation.

#### **2. Régulation de la glycémie**

L'homéostasie du glucose dépend de la balance entre les apports de glucose circulant provenant de l'alimentation et de la libération du glucose par le foie, et des besoins en glucose de l'organisme. Cette balance est régulée par un couple d'hormones sécrétées par le pancréas endocrine : le glucagon, hormone hyperglycémiant capable d'augmenter la glycémie et de favoriser la lipolyse (destruction des acides gras), et l'insuline ayant un effet hypoglycémiant. L'insuline est la seule hormone hypoglycémiant de l'organisme, elle favorise l'incorporation du glucose dans les tissus cibles, sous forme de glycogène, afin d'éviter une hyperglycémie prolongée.

L'insuline agit sur les cellules cibles en se fixant sur un récepteur spécifique à activité tyrosine-kinase. Ce récepteur est exprimé de façon ubiquitaire dans toutes les cellules de mammifères mais à des taux variables. L'insuline agit sur deux types de tissus cibles, les tissus périphériques qui comprend le foie, les adipocytes et le muscle squelettique, et sur le

pancréas (Bataille, 2002). La sous-unité  $\beta$  du récepteur porte l'activité tyrosine-kinase (Cheatham and Kahn, 1995) qui déclenche une voie de signalisation (cascade de phosphorylation) aboutissant à la phosphorylation de substrats endogènes.

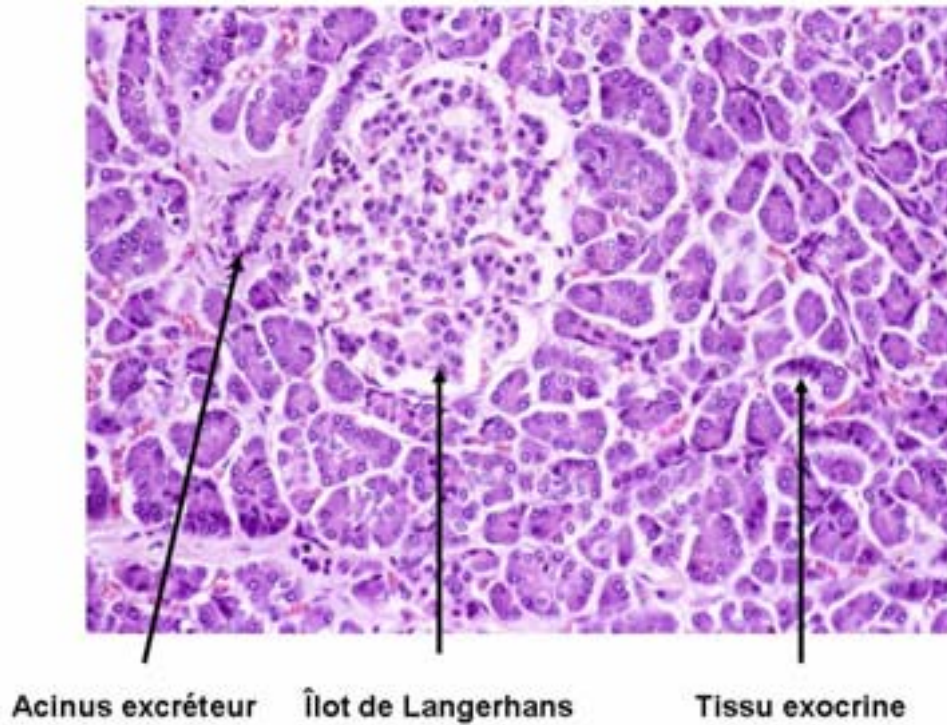
### 2.1. Effet de l'insuline sur les tissus périphériques

Un des effets de l'insuline en se fixant à son récepteur, est d'augmenter l'entrée du glucose dans les cellules cibles afin de diminuer la glycémie et de métaboliser le glucose. Ainsi dans les cellules musculaires et des adipocytes, le nombre de transporteur du glucose, GLUT-4, dont l'isoforme est spécifique du tissu cible, est augmenté à la surface membranaire via un recrutement par fusion à la membrane de vésicules portant les transporteurs (Cheatham et al., 1996).

Dans ces tissus, l'activation du récepteur de l'insuline déclenche également une voie de signalisation aboutissant à la régulation de protéine kinases et phosphatases impliquées dans la métabolisation du glucose en glycogène. La glycogénèse est ainsi activée dans le foie et les muscles, et les acides gras sont mis en réserve dans les adipocytes sous forme de triglycérides. Parallèlement, l'insuline a pour effet d'inhiber les voies de la néoglucogénèse hépatique et le catabolisme des lipides ( $\beta$ -oxydation).

### 2.2. Effet de l'insuline sur les cellules $\beta$ -pancréatiques

L'insuline stimule son auto-sécrétion par les cellules  $\beta$  (Borge et al., 2002). L'activation de son récepteur déclenche une cascade de phosphorylation aboutissant à l'inhibition de l'activité de la pompe calcique *sarco(endo)plasmic reticulum*  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA). La SERCA régule l'homéostasie calcique de la cellule et de ce fait la libération de l'insuline (voir partie III, chapitre B). De plus, l'insuline exerce un effet autocrine sur les cellules  $\beta$ -pancréatiques par l'intermédiaire de facteurs de transcription qui se traduit, par une augmentation de l'activité transcriptionnelle du gène codant pour l'insuline (Schuit et al., 2002) et une hausse de la stabilité des ARNm correspondant (Poitout et al., 2006). Ceci permet de renouveler les réserves en insuline suite à une sécrétion de l'hormone.



**Figure i-1: Coupe histologique d'un pancréas humain (agrandissement 66x)**

Sur cette coupe de pancréas colorée à l'éosine, on peut observer un îlot de Langerhans au sein du tissu exocrine. Un acinus excréteur est visible à gauche du tissu endocrine (îlot de Langerhans), il est entouré de tissu conjonctif.

(Source: Université de Duke, *Introduction to Systemic Histology*, Hale L.P.)

## B. Pancréas

L'insuline est produite et sécrétée uniquement par des cellules spécialisées localisées dans le pancréas. Chez l'Homme, le pancréas est un organe situé à proximité du foie et est relié au duodénum. Cet organe présente deux grandes fonctions : une fonction exocrine et une fonction endocrine.

La fonction exocrine du pancréas est de produire et de sécréter des sucs (ou enzymes) nécessaires à la transformation des aliments en substances simples, absorbables par l'intestin. Ces enzymes digestives sont des ribonucléases, désoxyribonucléases, lipases, amylases et des protéases telles que la trypsine et la chymotrypsine. Ces enzymes sont déversées dans le duodénum, diluées dans un fluide alcalin ayant pour but de neutraliser l'acidité du bol alimentaire en sortie de l'estomac.

Au sein du parenchyme exocrine contenant des cellules acineuses, les cellules endocrines sont regroupées en îlot autour de capillaires et forment des micro-organes appelés îlots de Langerhans (figure i-1). L'ensemble des îlots de Langerhans ne constitue que 1 à 3 % de la masse totale du pancréas (In't Veld et al., 1990).

Les îlots de Langerhans sont composés de quatre types cellulaires différents sécrétant des hormones distinctes intervenant dans l'homéostasie du glucose.

- Les cellules  $\beta$  synthétisent, stockent et libèrent l'insuline. En moyenne, une cellule  $\beta$  contient 10 000 granules remplis d'insuline (Eliasson et al., 1997). Ces cellules sont majoritaires au sein d'un îlot (60 à 80 %) et sont localisées plutôt au centre des îlots de Langerhans. En plus de l'insuline, les cellules  $\beta$  synthétisent et sécrètent d'autres hormones, telle que le peptide VGF. Ce peptide est localisé dans les vésicules contenant l'insuline (Snyder et al., 2003) et semble être impliqué dans la régulation de la balance énergétique de l'organisme (Salton et al., 2000).
- Les cellules  $\alpha$  synthétisent, stockent et sécrètent le glucagon, hormone hypoglycémiant. Ces cellules représentent 15 à 20 % des cellules d'un îlot.
- Les cellules  $\delta$  synthétisent, stockent et sécrètent la somatostatine, qui présente un effet inhibiteur sur la sécrétion d'insuline. Elles ne représentent que 5 % des cellules d'un îlot.
- Les cellules PP produisent et libèrent le peptide pancréatique. Le rôle physiologique de ce peptide est encore très peu connu. Ce type cellulaire est très minoritaire au sein d'un îlot (moins de 1 %).

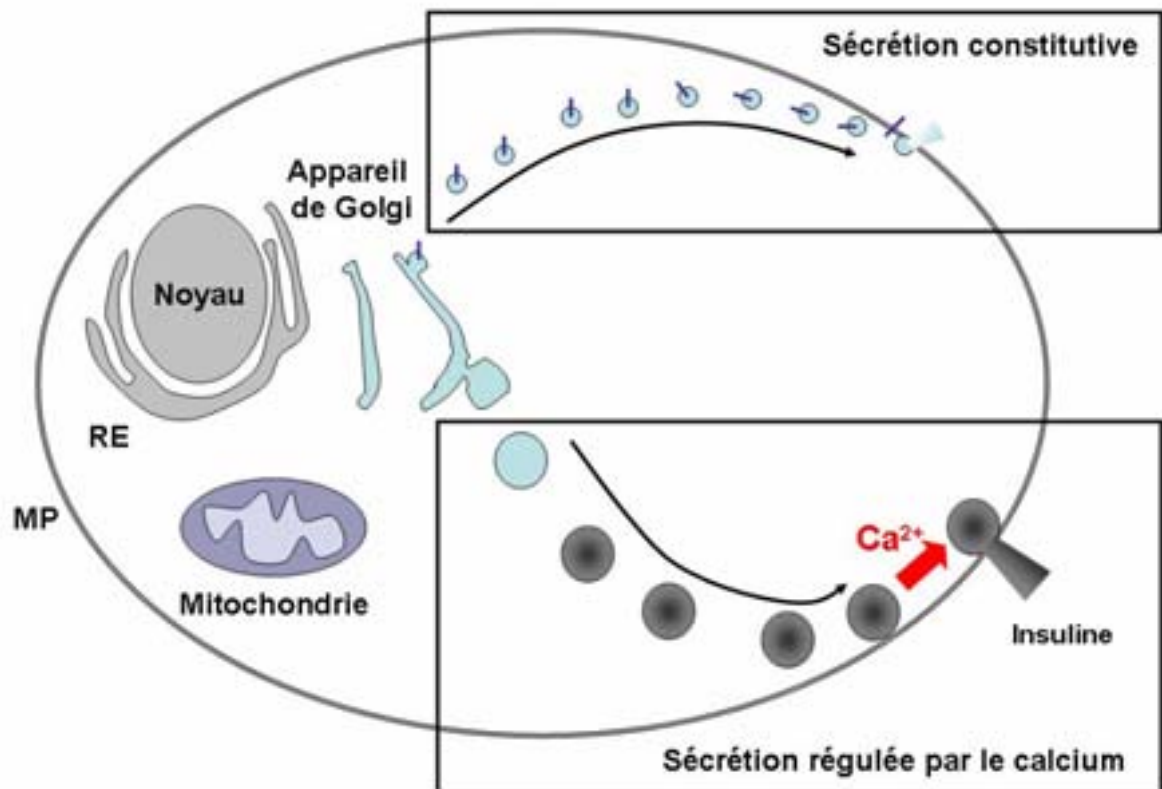
Comme je l'ai évoqué précédemment, les îlots de Langerhans sont localisés à proximité de capillaires permettant ainsi le passage dans le sang des différentes hormones sécrétées par les cellules endocrines du pancréas. Les îlots sont également fortement innervés, ce qui permet une régulation neuronale de la sécrétion d'insuline, comme nous le verrons dans le chapitre C paragraphe 6.

Vu la faible proportion des îlots de Langerhans dans le pancréas, l'hétérogénéité cellulaire et la présence des enzymes dans le tissu exocrine, l'isolement des cellules  $\beta$ -pancréatiques primaires est une opération techniquement délicate. De ce fait, les études sur les cellules  $\beta$ -pancréatiques s'effectuent souvent à l'aide de lignées cellulaires établies. Leurs avantages sont nombreux : facilité de culture, stabilité des cellules dans le temps et l'homogénéité cellulaire.

Plusieurs lignées cellulaires issues des cellules  $\beta$ -pancréatiques conservent de nombreuses caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des cellules primaires (Poitout et al., 1996). La lignée HIT-T15, lignée déposée à l'ATCC (CRL-1777), est dérivée d'une culture primaire de cellules  $\beta$  de hamster transformées par l'antigène T du virus SV40. Ces cellules se divisent et prolifèrent rapidement, et se transfectent facilement par les agents lipofectants. Néanmoins, elles possèdent des altérations de la voie de glycolyse qui empêchent une stimulation significative de la sécrétion de l'insuline par le glucose. La lignée de cellules MIN6 est issue de cellules primaires de souris. Le clone m9 peut sécréter de l'insuline en réponse à une gamme physiologique de glucose (Minami et al., 2000) mais cette caractéristique se perd rapidement au cours de la multiplication cellulaire. La lignée de cellules INS-1E est dérivée d'un insulinome de rat et ces cellules répondent de manière stable à des concentrations physiologiques de glucose (Asfari et al., 1992; Merglen et al., 2004).







**Figure i-2: Sécrétion constitutive et sécrétion régulée par le calcium dans une cellule  $\beta$**

Dans une cellule  $\beta$ , deux types de transport post-golgien sont mis en place : la sécrétion régulée par un stimulus déclencheur et défini (influx de calcium) et la sécrétion constitutive dont le stimulus déclencheur est difficilement identifiable.

RE: réticulum endoplasmique, MP: membrane plasmique.

## C. La cellule $\beta$ et la sécrétion régulée d'insuline

### 1. Deux types de sécrétion : régulée et constitutive

Les vésicules de sécrétion transportent leur contenu de l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane plasmique où leur membrane fusionne avec la membrane plasmique, libérant le contenu vésiculaire dans l'espace extracellulaire. Ce phénomène de libération est commun à toutes les cellules eucaryotes, de la levure jusqu'aux mammifères. Il existe deux modes de sécrétion différents (figure i-2) : la sécrétion régulée et la sécrétion constitutive.

#### 1.1. Sécrétion régulée par le calcium

La sécrétion régulée des vésicules nécessite un élément déclencheur précis, le calcium, permettant la fusion des membranes. Ce phénomène de sécrétion est largement répandu, en particulier dans les neurones, les cellules endocrines, les cellules neuro-endocrines ou bien encore les neutrophiles (Lindmark et al., 2002). Généralement, ce mode de sécrétion est mis en place dans le cas de la sécrétion d'enzymes, d'hormones et de neurotransmetteurs.

Récemment, ce type de sécrétion a également été mis en évidence dans des mécanismes de différenciation de surface cellulaire ou de réparation des blessures membranaires (Martinez et al., 2000). Dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques, l'insuline est contenue dans des granules de sécrétion et sa libération est induite suite à une augmentation de la concentration calcique intracellulaire.

#### 1.2. Sécrétion constitutive

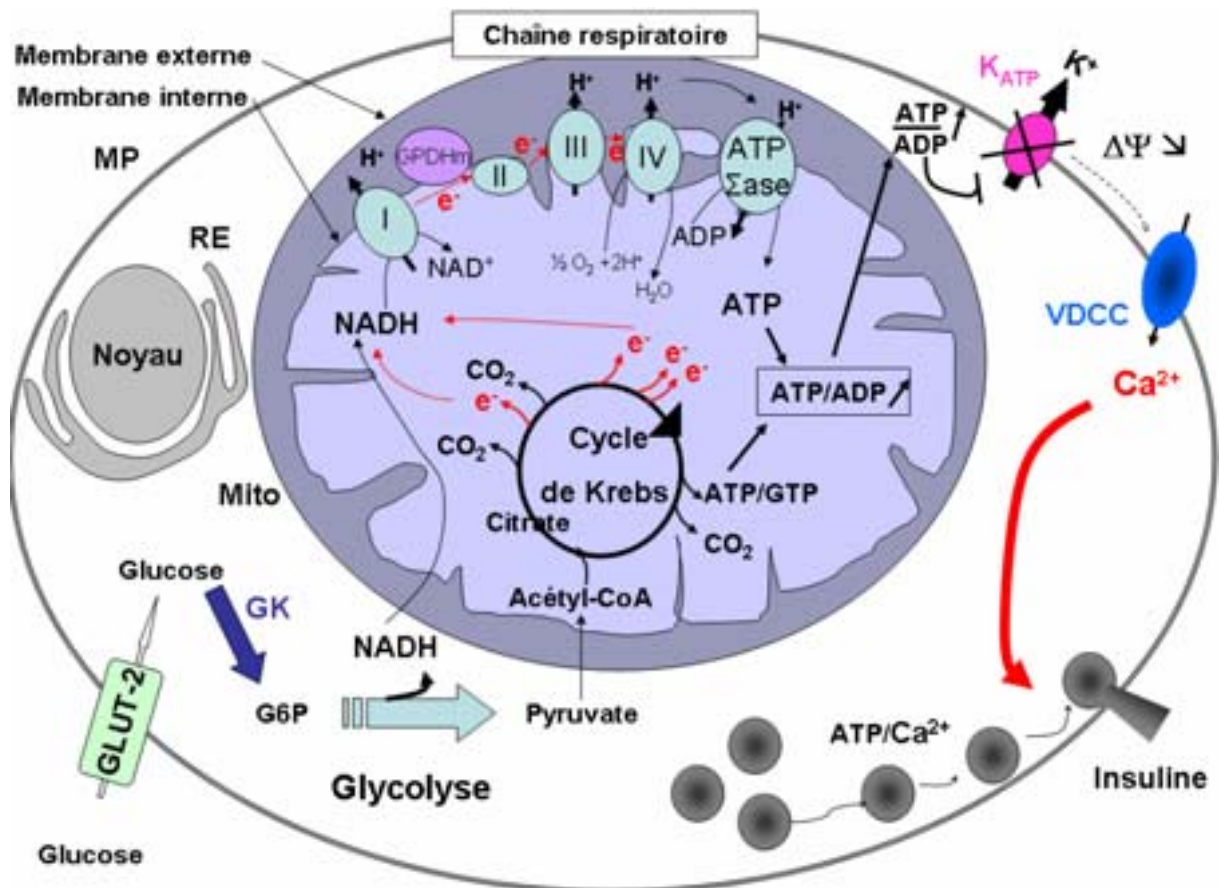
La sécrétion constitutive est un phénomène continu dont le stimulus déclencheur n'est pas clairement identifiable. Cette sécrétion permet de libérer les composants de la matrice extracellulaire et permet le renouvellement constant des constituants de la membrane plasmique (protéines et lipides membranaires). Il existerait une sécrétion constitutive des granules sécrétoires contenant l'insuline, qui concernerait 1% des granules sécrétoires (Bataille, 2002). Pourtant, ces observations sont controversées car des études ont montré des oscillations spontanées de la concentration calcique dans les cellules  $\beta$  au repos (Lajus et al., 2006). Ces oscillations seraient peut-être à l'origine de cette sécrétion qui serait ainsi régulée.

## 2. Transport et métabolisme du glucose dans les cellules $\beta$

La cellule  $\beta$  est capable de détecter l'augmentation de la glycémie et d'y répondre en sécrétant l'insuline par un processus de sécrétion régulée. Plusieurs mécanismes assurent de manière fiable la coordination entre les taux de glucose et la libération d'insuline. En soi aucun de ces mécanismes n'est réellement spécifique de la cellule  $\beta$ , cependant la présence et l'association d'isoformes spécifiques d'enzyme caractérisent la particularité de ce système.

En phase post-prandiale, la glycémie est élevée et le glucose va pénétrer dans la cellule grâce à son transporteur, GLUT. Il existe plusieurs isoformes du transporteur de glucose et chacune est spécifique du type cellulaire : GLUT-4 pour le muscle cardiaque et squelettique et les adipocytes, GLUT-2 dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques et les hépatocytes (Thorens et al., 1988), GLUT-1 dans les érythrocytes et les cellules du cerveau (Joost et al., 2002). Le transporteur du glucose est une protéine à 12 segments transmembranaires formant un pore à travers la membrane plasmique. Les taux d'expression ainsi que l'affinité au glucose sont variables selon l'isoforme, ce qui détermine l'incorporation du glucose dans les cellules. Dans la cellule  $\beta$ , l'isoforme exprimée est le GLUT-2 (Thorens, 2003a) et elle présente une forte affinité pour le glucose par rapport aux autres transporteurs GLUT. Ceci facilite l'entrée du glucose dans la cellule  $\beta$  et conduit à un équilibre de la concentration du glucose de part et d'autre de la membrane plasmique (Johnson et al., 1990; Tiedge and Lenzen, 1991). Le flux entrant de glucose est uniquement régulé par la différence de concentration du glucose de part et d'autre de la membrane plasmique.

Le glucose intracellulaire est alors pris en charge par une hexokinase qui le phosphoryle en glucose-6-phosphate (G6P) (figure i-3). Il existe plusieurs isoformes d'hexokinase, variables selon les tissus et possédant des caractéristiques biochimiques spécifiques suivant l'isoforme. Dans la cellule  $\beta$ , l'hexokinase est la glucokinase (GK) qui est spécifique de la cellule  $\beta$  et des hépatocytes (Tiedge and Lenzen, 1991). Cette enzyme possède deux grandes particularités. Premièrement, elle présente un  $K_M$  élevé (10 mM de glucose), ce qui implique qu'à des concentrations basses de glucose, l'enzyme phosphoryle lentement le sucre, et à l'inverse, à de fortes concentrations de glucose, la vitesse de phosphorylation est élevée. Deuxièmement, l'enzyme n'est pas inhibée par le produit de sa réaction. De ce fait, la glucokinase produit une quantité de G6P reflétant la quantité de



**Figure i-3 : Couplage direct entre le métabolisme du glucose et la sécrétion d'insuline**

Le glucose est transporté dans la cellule  $\beta$ , où il est métabolisé en pyruvate par la glycolyse. Le pyruvate pénètre ensuite dans la mitochondrie où il est transformé en acétyl-CoA qui entre dans le cycle de Krebs, aboutissant à une production d'équivalents réducteurs (NADH). Ces réducteurs subissent des phosphorylations oxydatives au niveau de la chaîne respiratoire, constituée des complexes I, II, III et IV et la GPDH mitochondriale. Ces complexes en parallèle expulsent des protons provoquant un gradient de protons qui est nécessaire à la production d'ATP par l'ATP synthase (ATP $\Sigma$ ase). La production d'ATP induit une augmentation du rapport ATP/ADP dans la mitochondrie et le cytosol. Suite à cette augmentation, les canaux  $K_{ATP}$  se ferment et provoquent la dépolarisation de la membrane plasmique. Les canaux calciques voltage-dépendants (VDCC) s'ouvrent alors et permettent l'entrée massive des ions  $Ca^{2+}$ , ce qui déclenche l'exocytose des vésicules contenant l'insuline.

RE: réticulum endoplasmique, MP: membrane plasmique, Mito: mitochondrie, GK : Glucokinase.

glucose dans le sang. Ces deux grandes caractéristiques font de la glucokinase le « senseur du glucose » (Borge et al., 2002; Deeney et al., 2000b).

Cette réaction catalysée par la glucokinase est la première étape de la glycolyse (figure i-3). Le G6P est ensuite métabolisé en pyruvate et en équivalents réducteurs (NADH, nicotinamide adénine dinucléotide). Le pyruvate est transporté dans la mitochondrie, transformé en acétyl-CoA qui entre dans le cycle de Krebs. Les équivalents réducteurs produits lors de la glycolyse et du métabolisme du pyruvate subissent les phosphorylations oxydatives de la chaîne respiratoire dans la mitochondrie. Au niveau de la membrane interne de la mitochondrie, les équivalents réducteurs cèdent deux électrons à un système de transporteurs (complexes I, II, III et IV) qui, par une cascade de réactions d'oxydo-réduction, amène ces électrons jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène moléculaire. La membrane interne est imperméable aux ions  $H^+$ , cependant, au cours de ce transfert électronique, il y a formation d'un gradient de protons de part et d'autre de cette membrane, ce qui permet la synthèse d'ATP (adénosine tri-phosphate) lors d'une réaction catalysée par l'ATP synthase mitochondriale. La forte production d'ATP entraîne une augmentation du rapport ATP/ADP mitochondrial, et par transport des adénines nucléotides phosphates à travers les membranes mitochondriales, une augmentation du rapport ATP/ADP dans le cytosol.

La présence de GLUT-2 et de la glucokinase dans la cellule  $\beta$ , permet d'obtenir un bon couplage entre le métabolisme du glucose et la production d'ATP. De plus, la cellule  $\beta$  possède une lactate déshydrogénase (LDH) présentant une faible activité ce qui diminue les fuites possibles du pyruvate vers la production de lactate (voie anaérobie) au détriment de la voie du cycle de Krebs (voie aérobie). Une autre particularité de la cellule  $\beta$  est la forte activité de la glycérol-phosphate déshydrogénase mitochondriale (GPDHm) qui permet l'oxydation des équivalents réducteurs et la mise en place du gradient de protons. Cette enzyme a une activité 60 fois plus importante que son équivalent hépatique (Sekine et al., 1994).

### 3. Les flux ioniques et la sécrétion d'insuline

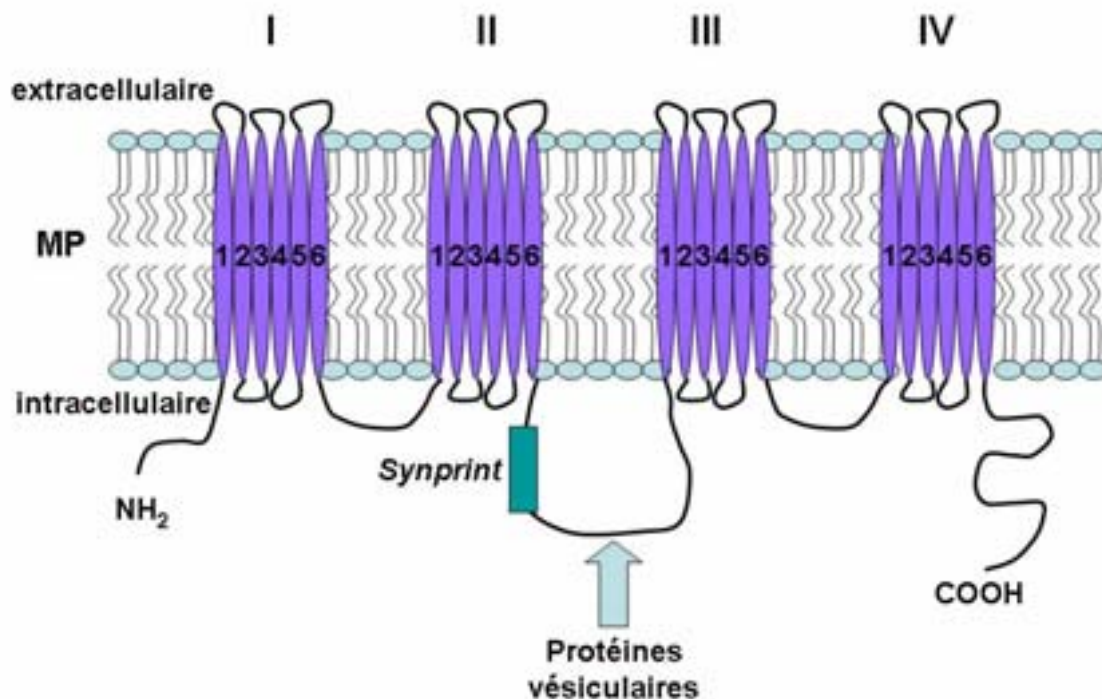
Une des grandes particularités de la cellule  $\beta$  est sa capacité à moduler des flux ioniques à travers la membrane plasmique en fonction de la glycémie et ainsi de réguler la sécrétion d'insuline.

#### 3.1. La cellule $\beta$ en condition de glycémie à jeun

Dans une cellule au repos, la différence de potentiel transmembranaire (le potentiel de membrane est de  $-70$  mV) est maintenue grâce à l'activité de deux pompes ioniques au niveau de la membrane plasmique, qui utilisent l'énergie fournie par l'ATP : la pompe sodium/potassium-ATPase ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase) et la pompe calcium-ATPase ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) (Bataille, 2002). La première de ces ATPases pompe en permanence du potassium sous forme ionisé ( $\text{K}^+$ ) vers l'intérieur de la cellule tout en sortant du sodium. La seconde ATPase expulse en permanence du calcium ionisé ( $\text{Ca}^{2+}$ ) libre vers l'extérieur ce qui conduit à une faible concentration calcique à l'intérieur de la cellule ( $100$ - $200$  nM) par rapport à la concentration extracellulaire (environ  $1$  mM). De plus, d'autres pompes calciques situées sur les organelles permettent de maintenir une faible concentration calcique dans le cytosol ; elles seront détaillées plus précisément dans la partie III.

Le potassium ( $\text{K}^+$ ) présente une concentration intracellulaire de  $150$  mM alors que celle du milieu extérieur est de  $4,5$  mM. Il existe donc un flux du  $\text{K}^+$  vers l'extérieur de la cellule qui compense les entrées et qui explique la concentration intracellulaire stable de cet ion. La sortie hors de la cellule du  $\text{K}^+$  est obtenue par un type particulier de canal spécifique à l'ion  $\text{K}^+$ . Ce canal dont l'ouverture et la fermeture sont contrôlées par l'ATP, s'appelle le canal potassique dépendant de l'ATP ou  $\text{K}_{\text{ATP}}$ .

Le canal  $\text{K}_{\text{ATP}}$  est exprimé dans de nombreux tissus (cœur, cerveau, pancréas) et est constitué de plusieurs sous-unités Kir et SUR. Quatre sous-unités Kir forment le pore du canal, et quatre sous-unités SUR (*Sulfonulurea Receptor*) régulent l'ouverture du pore. Les isoformes exprimées dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques sont de type Kir6.2 et SUR1. Ces canaux sont inhibés par l'ATP cytoplasmique qui se lie sur Kir6.2, et sont activés à faible concentration par l'ADP se liant aux domaines de liaison des nucléotides sur les sous-unités SUR1. La sous-unité SUR1 est la cible des sulfonylurées, médicament utilisé chez les patients diabétiques afin d'augmenter la sécrétion d'insuline en favorisant la fermeture de ces canaux.



**Figure i-4 : Structure de la sous-unité  $\alpha 1$  du canal calcique voltage-dépendant**

La sous-unité  $\alpha 1$  est composée de quatre domaines homologues I, II, III et IV constitués chacun de six hélices transmembranaires (1-6). Les domaines sont reliés entre eux par des boucles intracellulaires. La boucle entre les domaines II et III contient un motif appelé *Synprint* et les sites de liaison des protéines des vésicules sécrétoires. L'interaction des vésicules avec cette boucle du canal calcique permet le recrutement des vésicules au site de l'exocytose.



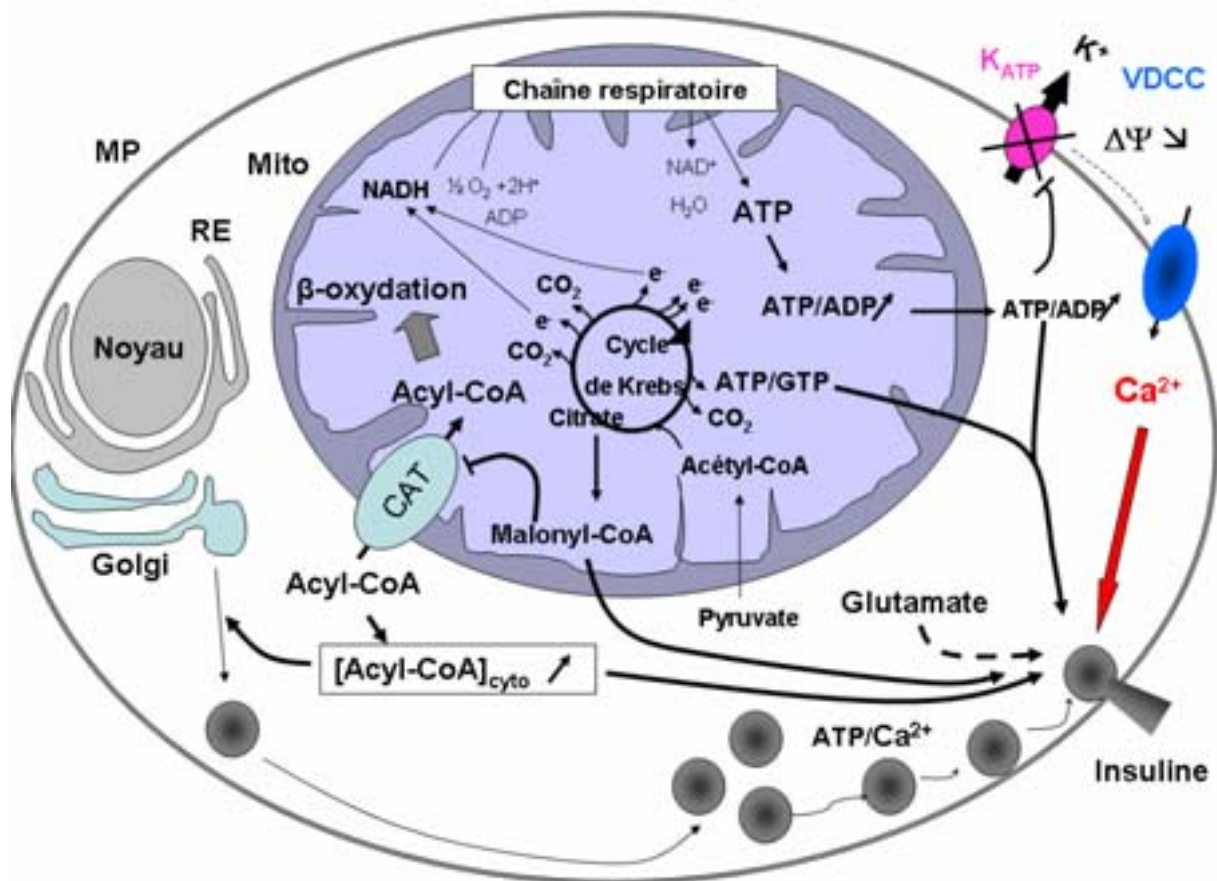
Dans une cellule  $\beta$  au repos, 70 à 80 % des canaux  $K_{ATP}$  sont dans un état fermé, la régulation d'ouverture de ces canaux, lors de la sécrétion d'insuline porte donc sur les 20 à 30 % restants (Bataille, 2002).

### 3.2. Mécanisme de libération : condition de glycémie élevée

L'élévation de la glycémie, suite à une prise alimentaire, induit la métabolisation du glucose dans la cellule  $\beta$ . Les concentrations des nucléotides varient et l'augmentation du rapport ATP /ADP provoque la fermeture des canaux potassiques ATP-dépendant (figure i-3). L'inhibition de l'efflux d'ions  $K^+$  entraîne une augmentation des charges positives à l'intérieur de la cellule et provoque une dépolarisation de la membrane plasmique (Ashcroft et al., 1984; Ashcroft et al., 1994). Cette dépolarisation déclenche l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants (VDCC pour « *voltage-dependent calcium channels* ») et l'entrée massive d'ions calcium dans la cellule suivant le gradient électrochimique (Arkhammar et al., 1987; Nilsson et al., 1987).

De nombreuses isoformes de VDCC existent et présentent des profils d'expression variables, qui reflètent des fonctions différentes (Fisher and Bourque, 2001). Les VDCC sont constitués d'une sous-unité  $\alpha 1$  qui forme le pore sensible au voltage et dont l'isoforme varie d'un canal à l'autre, et de plusieurs autres sous-unités qui peuvent être régulatrices de l'activité du canal, ou encore déterminer la localisation sub-cellulaire du canal. La sous-unité  $\alpha 1$  du canal est composée de quatre domaines homologues (I-IV) constitués chacun de six hélices transmembranaires, et reliés entre eux par des boucles (Seagar et al., 1999) (figure i-4).

Les types principaux de VDCC sont les canaux de type P/Q, de type N, de type T et de type L, qui se distinguent par leurs propriétés pharmacologiques et qui possèdent chacun des signatures électrophysiologiques propres. Ces cinq types de canaux sont exprimés dans des systèmes neuronaux, neuroendocriniens et endocriniens (Fisher and Bourque, 2001; Seagar et al., 1999). Le canal de type P/Q est principalement responsable de la neuroexocytose, bien que le canal de type N semble aussi être impliqué. Le canal de type L est sensible à des molécules pharmacologiques, les dihydropyridines (DHP). Les données pharmacologiques et électrophysiologiques tendent à montrer que le canal de type L est le canal majoritairement fonctionnel dans la sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$ -pancréatiques (Barg et al., 2001). En effet, les DHP bloquent 80 % de la réponse au glucose des îlots humains (Davalli et al.,



**Figure i-5 : Effets indirects du métabolisme du glucose sur la sécrétion d'insuline**

Le métabolisme du glucose produit des intermédiaires qui régulent la sécrétion de l'insuline. Le citrate produit par le cycle de Krebs est transformé en malonyl-CoA qui a pour effet d'inhiber l'activité de la carnitine palmitoyl transférase (CAT). La CAT est un transporteur mitochondrial qui permet le passage des acyl-CoA dans la mitochondrie afin qu'ils soient dégradés par la  $\beta$ -oxydation. L'inhibition de la CAT induit une augmentation des acyl-CoA dans le cytoplasme où ils vont stimuler la formation des vésicules de sécrétion en sortie de l'appareil de Golgi et activer la sécrétion d'insuline. Le glutamate et les nucléotides, ATP et GTP, produits lors du métabolisme du glucose exercent également un effet stimulateur sur la sécrétion des vésicules d'insuline.

MP : membrane plasmique, RE : réticulum endoplasmique, Golgi : appareil de Golgi, Mito : mitochondrie.

1996). Néanmoins, dans les îlots de rat, les VDCC de type P/Q, N et T sont également exprimés (Sher et al., 2003). Ainsi il apparaît que la réponse au glucose des cellules  $\beta$  fait intervenir différents types de VDCC. De même, il semblerait que différentes sous-unités des canaux calciques soient impliquées dans la première et la seconde phase de sécrétion de l'insuline (Jing et al., 2005). Les vésicules de sécrétion sont physiquement liées aux canaux calciques de type L et cette association est physiologiquement importante dans la sécrétion dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques (Barg et al., 2001). L'injection d'un peptide correspondant à la boucle (appelée *synprint*) reliant le domaine II et III de la sous-unité  $\alpha 1$  du canal calcique de type L, inhibe fortement la première phase de libération de l'insuline. La liaison entre les vésicules de sécrétion et les canaux calciques semble passer par cette boucle et cette interaction permettrait aux vésicules d'être recrutées au site d'exocytose (Wiser et al., 1999).

Au cours de leur transport vers la membrane plasmique, les granules de sécrétion subissent différentes étapes dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$ , décrites dans la partie II, chapitre C. Les étapes précoces ne nécessitent pas de fortes concentrations calciques (valeurs inférieures au  $\mu\text{M}$ ) alors que l'étape de fusion nécessite des concentrations calciques de l'ordre du mM (Gopel et al., 2004). L'entrée des ions  $\text{Ca}^{2+}$  se produit donc essentiellement suite à l'ouverture des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type L, et cette augmentation locale du calcium intracellulaire est le déclencheur de l'exocytose des vésicules contenant l'insuline.

La sécrétion d'insuline peut être stimulée de manière directe par augmentation de la concentration extracellulaire du  $\text{K}^+$ . Le chlorure de potassium va dépolariser la membrane plasmique et induire l'ouverture des VDCC et un influx calcique (Henquin, 2000). La mesure de l'exocytose stimulée par le KCl permet d'étudier les étapes tardives de l'exocytose sans lien avec le métabolisme du glucose.

#### **4. Effets indirects du glucose sur la sécrétion: effets distaux du glucose**

Le glucose exerce également des effets dits « distaux » sur la sécrétion d'insuline (figure i-5). Lors du métabolisme du glucose, des intermédiaires métaboliques (glutamate, malonyl-CoA, ATP) sont produits et régulent la sécrétion d'insuline (Deeney et al., 2000a). Ces modulateurs augmentent la sécrétion d'insuline déclenchée par une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire mais sans intervenir sur cette élévation du  $\text{Ca}^{2+}$  (Henquin, 2000). Cette action indirecte du glucose passe donc par des mécanismes indépendants des canaux  $\text{K}_{\text{ATP}}$ .

Les mécanismes conduisant à cette sécrétion ne sont que partiellement connus, mais il semblerait que le malonyl-CoA et les acides gras à longues chaînes soient responsables des effets distaux du glucose (Corkey et al., 2000; Corkey et al., 1989). En effet, la production de malonyl-CoA, suite à la production de citrate par le cycle de Krebs, entraîne l'inhibition de la carnitine palmitoyl transférase, transporteur mitochondrial (figure i-5). Ce transporteur en conditions normales permet aux acyl-CoA à longues chaînes d'entrer dans la mitochondrie afin d'y subir la  $\beta$ -oxydation. Lorsque ce transporteur est inhibé par le malonyl-CoA, la  $\beta$ -oxydation est inhibée et la concentration des acyl-CoA augmente dans le cytoplasme. Les acyl-CoA ont un effet stimulateur envers la sécrétion d'insuline dans la cellule  $\beta$  et favorisent la formation des vésicules en sortie de l'appareil de Golgi (Deeney et al., 2000a; Roduit et al., 2004).

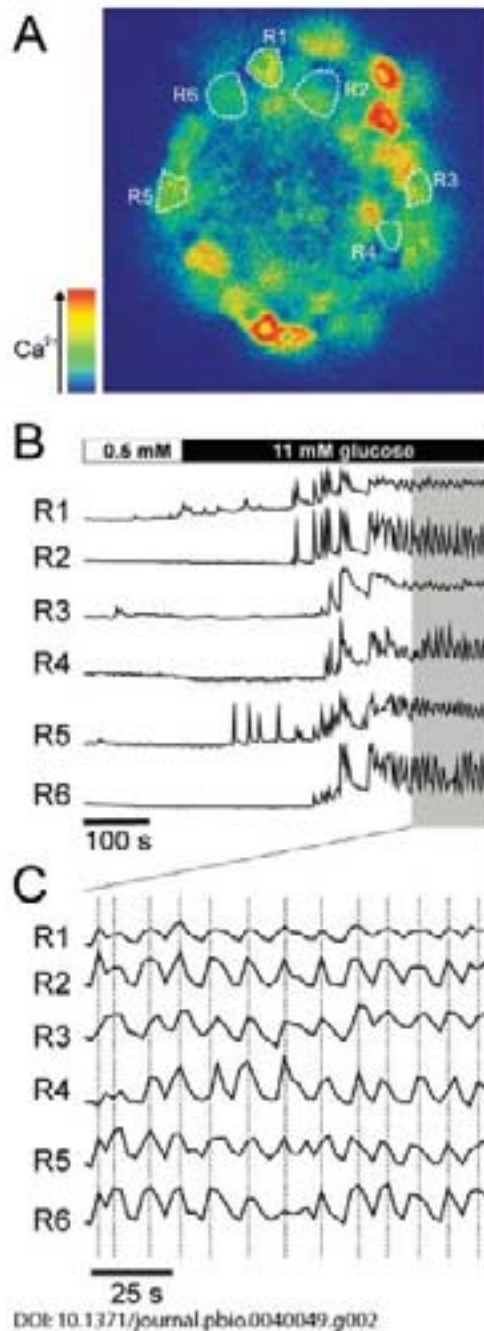
Le glutamate, produit par le métabolisme mitochondrial du glucose, ainsi que d'autres intermédiaires du cycle de Krebs ont également été proposé comme régulateurs de la sécrétion d'insuline (Maechler et al., 2002; Maechler and Wollheim, 1999).

Enfin, les nucléotides peuvent moduler la sécrétion en régulant l'état de phosphorylation de certaines protéines par l'intermédiaire de kinases (Evans et al., 2001). En outre, l'ATP intervient dans les étapes de transport des vésicules d'insuline. Des travaux ont également montré que le GTP produit lors du métabolisme du glucose, agit sur les étapes tardives de l'exocytose de façon indépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ , via l'activation de protéines G hétérotrimériques ou de protéines Rab (Cheviet et al., 2005; Iezzi et al., 1999; Proks et al., 1996).

## **5. La sécrétion biphasique de l'insuline**

Afin d'éviter des pics élevés de glycémie et étant donné la courte demi-vie de l'insuline, l'organisme a mis en place une sécrétion biphasique de l'insuline par le pancréas. La première phase correspond à une libération importante et transitoire de l'hormone pour diminuer rapidement les taux de glucose circulant. La deuxième phase présente des quantités d'insuline libérée moins grandes dans une échelle de temps plus longue. Il apparaît donc nécessaire que l'ensemble des cellules  $\beta$  synchronise leur sécrétion d'insuline.





**Figure i-6 : Le synchronisme des oscillations calciques au sein d'un îlot de Langerhans**

**A-** Au sein d'un îlot, 6 cellules  $\beta$  non adjacentes sont patch-clampées et nommées de R1 à R6.

**B-** La concentration calcique intracellulaire de chacune des six cellules est mesurée en fonction du temps. Suite à une stimulation par le glucose (11 mM glucose), la concentration calcique intracellulaire augmente et oscille avec une fréquence d'environ 10 secondes.

**C-** Après un délai d'environ 8 minutes, les oscillations calciques sont synchrones dans les six cellules  $\beta$ .

Adapté de (MacDonald and Rorsman, 2006)

### 5.1. Le synchronisme au sein d'un îlot

Récemment, une étude basée sur des mesures de capacitance a montré qu'au sein d'un îlot de cellules  $\beta$ , les oscillations du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire sont synchrones entre les cellules (MacDonald and Rorsman, 2006). En effet, dans l'expérience, six cellules  $\beta$  non adjacentes sont patch-clampées et les oscillations calciques sont mesurées (figure i-6). En réponse au glucose (11 mM), les cellules présentent des oscillations calciques synchrones. Les cellules  $\beta$  d'un même îlot sont donc électriquement couplées et fonctionnent comme un *syncytium*.

Les cellules  $\beta$ -pancréatiques expriment une des protéines de jonction de type GAP, la connexine-36 (Ravier et al., 2005) qui forment des pores permettant une connexion entre les cytoplasmes de cellules adjacentes. L'inhibition d'expression de la connexine-36 provoque la perte des oscillations de sécrétion d'insuline alors que les oscillations calciques des cellules individuelles sont maintenues. Ces connexions entre les cellules sont donc responsables de ce synchronisme. De plus, une autre étude, réalisée par l'équipe de Rocheleau (Rocheleau et al., 2006), a mis en évidence l'importance fonctionnelle du couplage électrique entre les cellules dans le synchronisme de la libération d'insuline. Des îlots de souris transgéniques, ayant une mosaïque d'expression des canaux  $\text{K}_{\text{ATP}}$  (70% des cellules ont des canaux  $\text{K}_{\text{ATP}}$  non fonctionnels) présentent une sécrétion d'insuline normale en réponse au glucose. A l'inverse, individuellement, les cellules possédant un canal non fonctionnel ne répondent plus à la stimulation par le glucose car les cellules ne dépolarisent pas et le calcium ne rentre plus dans la cellule. Il apparaît donc que les connexions cytoplasmiques entre cellules permettent la transmission des variations calciques intracellulaires d'une cellule fonctionnelle à une cellule, possédant un  $\text{K}_{\text{ATP}}$  non fonctionnel, ne répondant plus au glucose. Les interactions cellule/cellule permettent donc de restaurer le couplage entre le métabolisme du glucose et les oscillations calciques.

## 5.2. La sécrétion biphasique

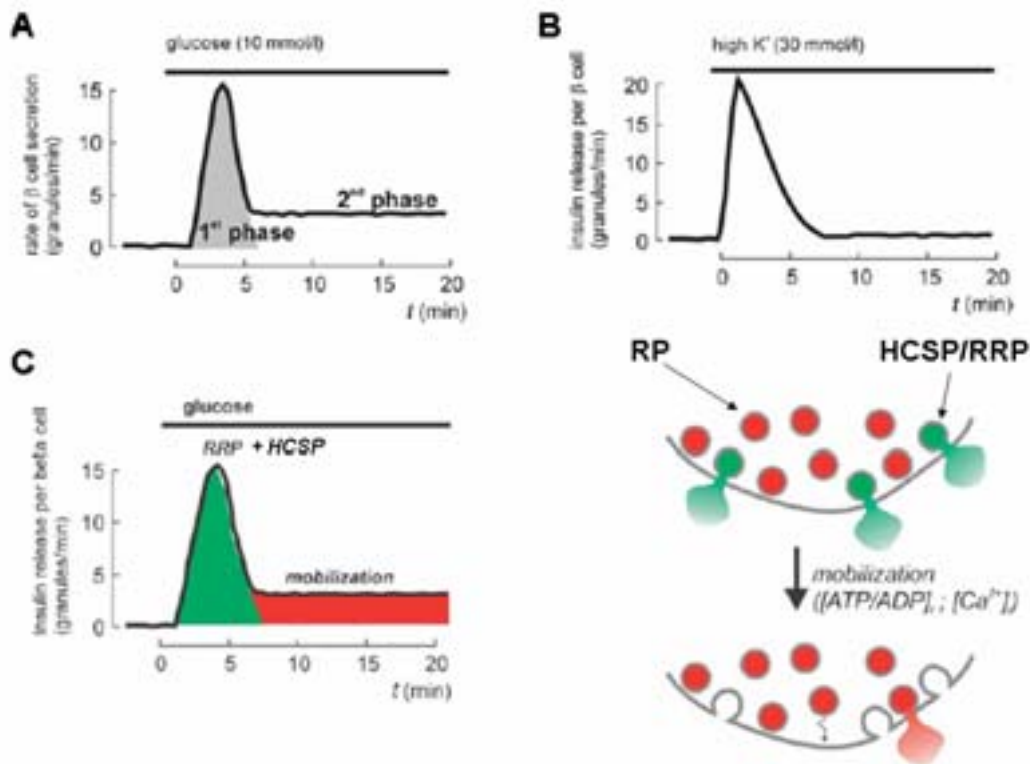
L'augmentation du taux de glucose entraîne, chez l'Homme particulièrement, deux phases de sécrétion de l'insuline. Des études réalisées sur un pancréas isolé de rat, perfusé de façon constante pendant 30 minutes par une concentration stimulante de glucose (environ 10mM), ont montré un profil biphasique de la sécrétion d'insuline (Henquin, 2000). Dans un premier temps, après un délai d'environ 1 minute, suite à l'élévation de la concentration du glucose dans la cellule  $\beta$ , la sécrétion de l'insuline augmente, puis diminue sans revenir au niveau basal de la sécrétion. Ce pic de sécrétion correspond à la première phase de libération de l'insuline, complète après 10 à 15 minutes (figure i-7A). Elle peut être suivie par une reprise de la sécrétion moins intense mais soutenue, appelée seconde phase. Lors d'une stimulation par une forte concentration en KCl, seule la première phase de sécrétion apparaît (figure i-7B). Effectivement, cette reprise de la sécrétion ne se produit que si la molécule à l'origine de la sécrétion est un nutriment, ce qui laisse supposer que cette seconde phase requiert de l'énergie ou des facteurs de couplages nécessaires à la mobilisation des vésicules vers le site d'exocytose (figure i-7C) (Rorsman et al., 2000).

Différents mécanismes peuvent être impliqués pour expliquer ces observations :

La première possibilité viendrait de l'hétérogénéité de la réponse au glucose des cellules  $\beta$  au sein d'un îlot. Certaines cellules  $\beta$  répondraient préférentiellement lors de la première phase de sécrétion et d'autres répondraient au cours de la seconde phase.

La seconde possibilité serait que la sécrétion biphasique n'est pas la résultante d'une hétérogénéité au niveau de la population de cellules, mais d'une hétérogénéité fonctionnelle des granules de sécrétion. Cette hypothèse repose sur des observations morphologiques, des mesures de capacitance et d'électrophysiologie qui ont permis de mettre en évidence l'existence de trois pools distincts de vésicules (Barg et al., 2001; Olofsson et al., 2002; Rorsman et al., 2000; Rorsman and Renstrom, 2003). Le principe de la capacitance repose sur l'augmentation de la surface membranaire d'une cellule après fusion d'une vésicule de sécrétion avec la membrane plasmique. Il en résulte une augmentation de la capacitance de la membrane qui peut être mesurée avec une haute précision temporelle (microseconde à la milliseconde). Cette technique permet de mesurer en temps réel les événements de fusion des vésicules au niveau d'une cellule unique.





**Figure i-7 : La sécrétion biphasique de l'insuline en réponse au glucose**

**A-** Schématisation de la sécrétion d'insuline dans un îlot de Langerhans de souris, stimulée par une augmentation de la concentration de glucose extracellulaire (10 mM glucose). Le nombre de granules sécrétés par minute est estimé par la quantité moyenne d'insuline contenue dans un granule ( $1,6 \cdot 10^{-18}$  mol) et en considérant qu'en moyenne un îlot contient 1000 cellules  $\beta$ . Le glucose déclenche la libération d'insuline après un délai d'environ 1 minute, temps nécessaire à la métabolisation du glucose. La sécrétion d'insuline est biphasique.

**B-** Suite à une stimulation par le KCl (30 mM), la sécrétion de l'insuline par l'îlot de souris est immédiate et monophasique. Seule la première phase correspondant au pic d'insuline est conservée.

**C-** Le profil biphasique de la sécrétion d'insuline est la résultante de l'existence de plusieurs pools de vésicules. Les pools RRP (*Readily releasable pool*) et HCSP (*Highly calcium-sensitive pool*) sont rapidement re-largables (en vert) et la libération de leur contenu correspond à la première phase de sécrétion. Le pool de réserve (RP, en rouge), doit subir des modifications biochimiques afin d'être mobilisé à proximité de la membrane plasmique et libéré, correspondant ainsi à la deuxième phase.

Adapté de (Rorsman and Renstrom, 2003)

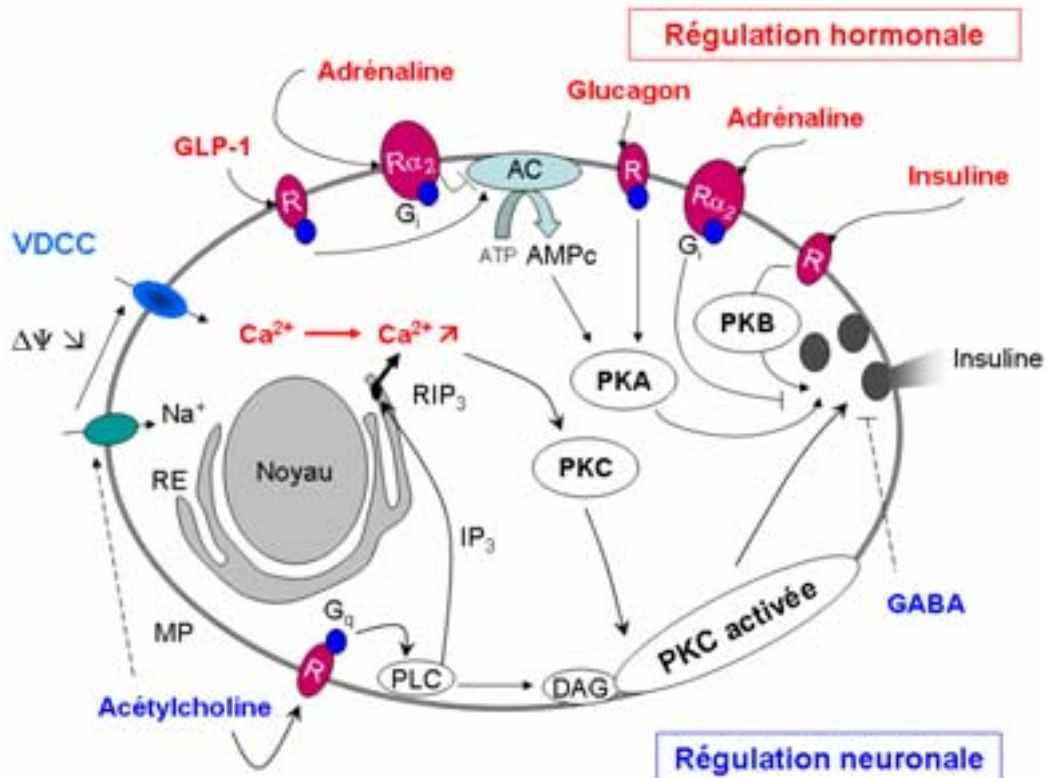
### 5.3. Les pools de vésicules

Trois pools vésiculaires ont été déterminés et sont définis en fonction de leur cinétique de fusion qui pourrait refléter une différence entre leur distance à la membrane plasmique. La première phase de sécrétion correspondrait à la libération du pool de vésicules rapidement re-largables (*readily releasable pool*-RRP) et la seconde phase plus tardive correspondrait à la fusion des vésicules contenues dans le pool de réserve (*reserve pool*-RP) (Neher, 1998). Le troisième pool de vésicules, appelé HCSP (*highly calcium-sensitive pool*) a une sécrétion extrêmement rapide ( $10\text{-}100\text{s}^{-1}$ ) et la fusion membranaire des vésicules se réalise pour des concentrations calciques intracellulaires inférieures à  $10\ \mu\text{M}$  (Wan et al., 2004; Yang and Gillis, 2004). L'exocytose du pool HCSP participerait donc à la première phase de sécrétion. Ce pool contient peu de vésicules et son contenu augmente considérablement suite à une stimulation de la PKC par des esters de phorbol comme le PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) ou par la forskoline qui active l'adénylate cyclase et donc augmente la production d'AMPc qui stimule la PKA. La taille du pool RRP est également augmentée suite à une de ces stimulations mais à un degré moindre (Wan et al., 2004). Ces vésicules HCSP fusionnent avec la membrane plasmique pour de faibles concentrations calciques cytosoliques ( $< \mu\text{M}$ ) (Yang et al., 2002) et il semblerait qu'elles soient reliées aux canaux calciques (Barg et al., 2001; Yang and Gillis, 2004), mais cette liaison est controversée.

Les pools de vésicules RRP et HCSP ne présentent pas de différence morphologique ni de différence de cinétique de fusion, seule leur affinité apparente pour le calcium diffère ( $K_d$  RRP  $\sim 20\ \mu\text{M}$ ;  $K_d$  HCSP  $\sim 1\ \mu\text{M}$ ) (Barg and Rorsman, 2004). L'existence de ces deux pools suggère qu'un senseur calcique de haute affinité pourrait ajuster la libération d'insuline en fonction des variations modestes ou importantes de la concentration calcique intracellulaire (Yang and Gillis, 2004). Une autre possibilité pour expliquer ces deux pools de vésicules, viendrait de la présence de deux senseurs calciques présentant des affinités calciques distinctes et qui seraient localisés spécifiquement sur les deux pools (Barg and Rorsman, 2004). Une troisième explication serait que les deux pools présentent des distances différentes aux canaux calciques.

Des données morphologiques et la mesure de la quantité d'insuline sécrétée après stimulation par le glucose ont déterminé qu'une cellule  $\beta$  contient en moyenne 10 000 granules de sécrétion et que les RRP représentent entre 40 et 80 granules sécrétoires rapidement mobilisables en réponse au glucose (Rorsman and Renstrom, 2003). Le pool





**Figure i-8 : Les régulations neuronales et hormonales de la sécrétion d'insuline**

Deux grands types de régulations permettent de moduler la sécrétion d'insuline d'une cellule  $\beta$  : la régulation via des neurotransmetteurs et la régulation via des hormones. Les cellules  $\beta$  sont innervées par des neurones à acétylcholine, ayant un effet amplificateur sur la sécrétion d'insuline passant par une voie dépendante de l' $IP_3$  qui se lie à ses récepteurs sur le RE ( $RIP_3$ ) et une voie dépendante des canaux calciques voltage-dépendants (VDCC) peu caractérisée (en pointillés). Le GABA inhibe la sécrétion par une voie encore mal connue (en pointillés). Plusieurs hormones telles que le GLP-1, le glucagon et l'insuline activent, via des voies de signalisation impliquant la PKA ou la PKB, la sécrétion d'insuline. Au contraire, l'adrénaline par un mécanisme indirect impliquant une hypoactivation de la PKA via l'inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase (AC) et un mécanisme direct par des protéines G hétérotrimériques, inhibe la libération d'insuline.

HCSP contient seulement 4 à 10 granules, soit environ un dixième du RRP. L'épuisement rapide des pools de RRP et HCSP serait à l'origine de la chute brutale de l'insulinémie en fin de première phase. La libération du pool de réserve correspondrait à la seconde phase de sécrétion. Ces vésicules sont mobilisables dans une échelle de temps plus longue et couplée au métabolisme des nutriments. Cette étape de mobilisation nécessite donc un apport d'énergie.

## 6. Les régulateurs de la sécrétion d'insuline

Plusieurs facteurs de régulation influencent la sécrétion d'insuline afin de préparer le pancréas à une sécrétion d'hormone et d'optimiser la réponse au glucose ou d'inhiber la sécrétion en cas de stress. Majoritairement, on distingue deux grands types de facteurs de régulation, les signaux neuronaux et hormonaux (figure i-8).

### 6.1. Les signaux neuronaux

#### 6.1.1. L'acétylcholine

Les îlots de Langerhans sont innervés par des neurones du système parasympathique, les neurones à acétylcholine (ACh). L'effet majeur de l'ACh sur la sécrétion d'insuline est la potentialisation de l'effet du glucose (Gilon and Henquin, 2001). En effet, l'ACh agit en se fixant sur ses récepteurs qui appartiennent à la famille des récepteurs muscariniques M3 couplés aux protéines G hétérotrimériques (*G-proteins coupled receptors*-GPCR). Cette fixation provoque l'activation d'une protéine G de type Gq qui va alors activer la phospholipase C (PLC) (figure i-8). La PLC activée, est alors capable de catalyser la coupure du phosphatidyl inositol-(4,5)-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) en diacylglycérol (DAG) et en inositol-(1,4,5)-triphosphate (IP<sub>3</sub>). L'IP<sub>3</sub> libéré dans le cytosol va se lier à son récepteur localisé au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et l'activation de ces récepteurs déclenche la libération des réserves de calcium du RE. Le calcium libre va activer la protéine kinase Ca<sup>2+</sup>-dépendante (PKC) et induire sa translocation du cytosol vers la membrane plasmique où elle se lie au DAG, afin de phosphoryler ses cibles moléculaires qui sont impliquées dans la stimulation de la sécrétion d'insuline (figure i-8). Plusieurs isoformes de la PKC sont connues mais actuellement peu de données permettent de déterminer celle mise en jeu dans cette voie de signalisation (Carpenter et al., 2004; Nesher et al., 2002; Warwar et al., 2006). Le calcium

stimule l'activité d'une autre kinase, la calmoduline kinase, qui va favoriser la mobilisation des granules de sécrétion (Gromada et al., 1999).

De plus, un effet direct de l'ACh sur la sécrétion d'insuline a été découvert. L'ACh serait capable de dépolariser la membrane plasmique des cellules  $\beta$  par un mécanisme  $\text{Na}^+$ -dépendant encore mal compris. L'ACh provoquerait une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique aux ions  $\text{Na}^+$  provoquant une dépolarisation de la membrane et l'activation des canaux calciques voltages dépendants (Gilon and Henquin, 2001).

L'effet majeur de l'ACh est de stimuler la sécrétion d'insuline durant la phase d'absorption lors la digestion mais également de rendre les vésicules plus facilement libérables.

### 6.1.2. L'acide $\gamma$ aminobutyrique (GABA)

L'acide  $\gamma$  aminobutyrique (GABA) est un neuromédiateur à effet paracrine et autocrine inhibiteur sur la sécrétion de l'insuline (Braun et al., 2004; Shi et al., 2000). La signalisation induite par le GABA est peu connue dans les cellules  $\beta$  (figure i-8). Ce neuromédiateur est exprimé dans les cellules  $\beta$  et est localisé dans de petites vésicules de type synaptiques (SLMV, *synaptic-like microvesicle*).

## 6.2. Les signaux hormonaux

### 6.2.1 Le peptide GLP-1 (*glucagon-like peptide*)

Lors de la digestion du bol alimentaire, les cellules de type L de l'intestin libèrent un peptide, le GLP-1 (*glucagon-like peptide*). La sécrétion du GLP-1 permet à l'organisme de préparer la sécrétion d'insuline post-prandiale (Thorens, 2003b). En effet, le peptide est libéré dans l'intestin, diffuse dans le sang et va se fixer sur des récepteurs de type GPCR localisés sur la membrane plasmique des cellules  $\beta$  (figure i-8). La fixation du GLP-1 sur son récepteur induit l'activation de l'adénylate cyclase (AC) qui catalyse la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), qui active à son tour la protéine kinase AMPC-dépendante (PKA) (Gromada et al., 1998). La PKA est une sérine/thréonine kinase dont de nombreux substrats sont des composants clés de la machinerie de sécrétion.

L'effet majeur de l'activation de cette kinase est une stimulation de la sécrétion d'insuline (Nesher et al., 2002) en augmentant la sensibilité au calcium. De plus, cette enzyme phosphoryle des protéines impliquées dans l'activation de facteurs de transcription du gène codant pour l'insuline ou pour d'autres protéines vésiculaires (Knoch et al., 2006). D'autres effets sont supposés, comme la phosphorylation des canaux  $K_{ATP}$  et des canaux calciques voltages dépendant de type L, déclenchant l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire (Gromada et al., 1997).

### 6.2.2. Le glucagon

Le glucagon est une hormone hyperglycémiante, synthétisée et libérée par les cellules  $\alpha$  des îlots de Langerhans. Cette hormone a un effet paracrine sur les cellules  $\beta$  et amplifie la libération de l'insuline en réponse au glucose. Le glucagon active une voie de signalisation dépendante de la PKA mais qui mettrait en jeu des récepteurs distincts de ceux de la voie d'activation par le GLP-1 (Gromada et al., 1997) (figure i-8).

### 6.2.3. L'adrénaline

L'adrénaline est une hormone libérée en cas de stress ou d'effort physique intense. Dans ces conditions, l'organisme nécessite de fortes quantités de glucose circulant, et l'adrénaline est sécrétée afin d'inhiber la voie de libération de l'insuline. Cette hormone se lie à son récepteur couplé à la protéine  $G_i$  qui induit une inhibition de l'AC provoquant une chute d'AMPc et une hypoactivation de la PKA (Debuyser et al., 1991a; Debuyser et al., 1991b) (figure i-8). Néanmoins, la seule contribution de cette voie ne peut expliquer l'effet inhibiteur important de l'adrénaline. Il a été montré qu'elle active une voie dépendante du GTP, impliquant les protéines G hétérotrimériques (Ullrich and Wollheim, 1988), et que la protéine  $G\alpha_i$  est principalement impliquée dans cette inhibition, en exerçant un effet direct sur l'exocytose, sans l'implication d'autres seconds messagers (Lang et al., 1995).

#### 6.2.4. L'insuline

L'insuline présente un effet autocrine et paracrine sur les cellules  $\beta$  (Elghazi et al., 2006), qui provoque une stimulation de la synthèse de l'insuline et de sa libération (Velloso et al., 1995). L'insuline active une voie de signalisation impliquant la protéine kinase B (PKB) (figure i-8).

La stimulation du récepteur à l'insuline dans les cellules  $\beta$ , active également la translocation du facteur de transcription PDX-1, responsable de la transcription du gène codant pour l'insuline (Melloul et al., 2002). Un autre des effets de l'activation du récepteur, est la libération des réserves calciques du RE via la régulation de la pompe SERCA (Borge et al., 2002). L'effet autocrine/paracrine majeur de l'insuline sur les cellules  $\beta$  est donc une augmentation de sa propre synthèse et libération.

#### 6.3. Agents pharmacologiques (sulfonylurées)

Les agents pharmacologiques de la classe des sulfonylurées stimulent la sécrétion d'insuline. Ces molécules agissent en se fixant sur les sous-unités SUR-1 (*Sulfonylurea receptor*) des canaux  $K^+$  ATP-dépendants, ce qui a pour effet d'induire leur fermeture et donc d'entraîner la dépolarisation de la cellule (Bataille, 2002). Les sulfonylurées agissent aussi sur la maturation des vésicules contenant l'insuline. Les granules de sécrétion subissent un processus d'acidification nécessaire à leur maturation (voir partie II). La diminution du pH dans les vésicules est dépendante d'une pompe à protons ATP-dépendante. L'entrée des protons  $H^+$  est accompagnée d'une entrée d'ions  $Cl^-$  permettant de maintenir l'électroneutralité dans les vésicules. Le canal chlore responsable de l'entrée des ions  $Cl^-$  est régulé par les sulfonylurées qui en stimulant l'entrée des ions chlorure, exerceraient une activation de la maturation des vésicules et donc une amplification de la sécrétion d'insuline (Renstrom et al., 2002).

Ces molécules sont utilisées comme agents thérapeutiques dans les cas de diabète de type 2.



## 7. Dérégulation de l'homéostasie du glucose : Diabètes sucrés

Le diabète sucré constitue un problème de santé publique en France et dans le monde entier car il est l'une des maladies endocriniennes les plus fréquentes et touche de plus en plus de personnes. On estime à 151 millions le nombre de personnes souffrant de diabète dans le monde dont environ 2 millions en France en 2000 (Zimmet et al., 2001).

Il existe deux types de diabètes sucrés qui se caractérisent en phase tardive par la présence de sucres dans les urines (glycosurie).

Le diabète de type 1, dit insulino-dépendant, est une pathologie dont l'origine est une maladie auto-immune conduisant à la destruction des cellules  $\beta$ -pancréatiques. Ce diabète représente une faible proportion des diabétiques et touche souvent des personnes jeunes (moins de 40 ans).

Le diabète de type 2, dit non-insulino-dépendant, est de loin le plus fréquent (plus de 90 à 95 % des cas) (Moller, 2001) et apparaît souvent à l'âge adulte. Cette pathologie est une maladie polygénique et des facteurs environnementaux comme le poids, l'activité physique et l'âge influencent également l'apparition et le développement de la maladie (Zimmet et al., 2001).

Le diabète de type 2 est caractérisé par une résistance à l'insuline des tissus cibles, dite insulino-résistance, et une altération de la sécrétion d'insuline par les îlots. L'insulino-résistance des tissus périphériques et des hépatocytes conduit à des taux de glucose dans le sang élevés et à une augmentation de la production de glucose hépatique. Pour compenser, les cellules  $\beta$ -pancréatiques augmentent la sécrétion d'insuline, ce qui provoque une hyperinsulinémie. Cette hausse du taux d'insuline renforce l'insulino-résistance des tissus cibles. A long terme, les expositions régulières des cellules à de forts taux de glucose et d'acides gras ont des effets toxiques, notamment sur le fonctionnement des cellules  $\beta$ -pancréatiques qui ne sécrètent plus d'insuline. Certaines données placent une insuffisance des cellules  $\beta$  très tôt dans la pathogenèse de la maladie. Cependant, l'ordre d'apparition des événements, c'est-à-dire le défaut de cellules  $\beta$  et l'insulino-résistance, reste un sujet à débattre.

Un régime contrôlé en sucres, restrictif en lipides, de l'exercice physique et des injections d'insuline, représentent le traitement contre les diabètes sucrés de type 1 et 2.

Les sulfonylurées sont utilisés comme médicament pour traiter le diabète de type 2. Ces molécules permettent d'améliorer la sécrétion d'insuline en bloquant les canaux  $K^+$  ATP-

dépendants. D'autres molécules comme les thiazolidinediols sensibilisent les tissus cibles à l'action de l'insuline (Moller, 2001). De même, certains médicaments agissent en réduisant la production de glucose hépatique (metformine) ou en limitant l'absorption du glucose au niveau intestinal (inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase).

La recherche de nouveaux traitements plus efficaces se poursuit, notamment dans le développement de pancréas artificiels et de greffes de pancréas. Par ailleurs, une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires contrôlant la sécrétion d'insuline permettrait le développement de nouvelles cibles thérapeutiques.

## II. LES ASPECTS MOLECULAIRES DE LA SECRETION D'INSULINE

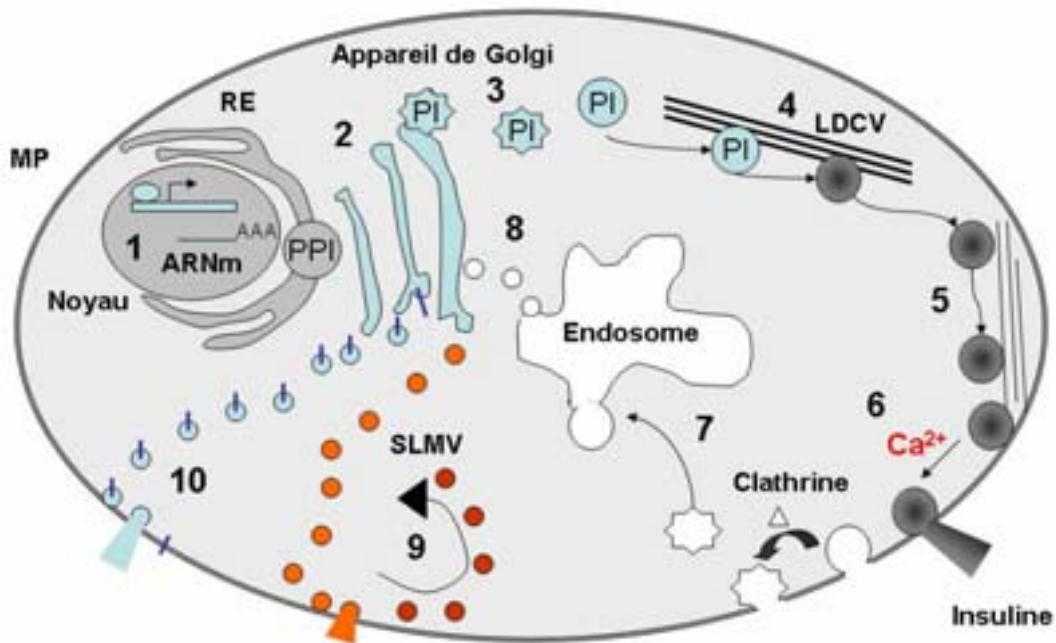
### A. Biosynthèse et maturation de l'insuline

La quantité d'insuline libérée dans le sang (ou insulinémie) est régulée à différentes étapes entre sa synthèse et sa libération, au niveau de l'expression génique, de l'ARNm, de la maturation de la protéine, du trafic vésiculaire et de l'exocytose des granules.

#### 1. Transcription du gène et traduction de la préproinsuline

Chez les mammifères adultes, l'expression du gène codant l'insuline est limitée aux cellules  $\beta$ -pancréatiques. L'insuline est le produit d'un gène unique chez l'homme qui est localisé sur le chromosome 11. Par contre, chez la souris et le rat, il existe deux allèles de ce gène. De nombreux facteurs de transcription (PDX-1 ou CREB) sont impliqués dans la régulation du taux d'expression du gène codant pour l'insuline. Le glucose, ainsi que d'autres nutriments, sont des régulateurs de l'expression génique. En effet, la liaison du facteur de transcription PDX-1 (*pancreatic duodenal homeobox factor 1*) sur la région régulatrice du promoteur du gène codant pour la préproinsuline, est sous la dépendance du glucose. De plus, le glucose contrôle toutes les étapes de l'expression du gène codant pour l'insuline, dont la transcription, l'épissage et la stabilité des ARNm. Cette régulation métabolique et tissu-spécifique permet à la cellule de renouveler son stock d'insuline pendant et entre les phases de sécrétion (Poitout et al., 2006).

L'insuline est initialement produite sous la forme d'un précurseur, la préproinsuline (PPI). L'ARN messager de la PPI est stabilisé dans le cytosol pour constituer une réserve en cas d'un besoin important en insuline (Welsh et al., 1986). La PPI contient un peptide signal de 25 acides aminés, qui lui permet d'être transloquée de manière co-traductionnelle dans la lumière du RE. Le peptide signal est immédiatement clivé, la protéine devient la proinsuline (PI) et transite à travers le RE jusqu'à l'appareil de Golgi où la proinsuline s'associe en structures hexamériques. Au niveau de l'appareil de Golgi, la proinsuline subit des modifications post-traductionnelles telles que la formation de ponts disulfures intramoléculaires (Huang and Arvan, 1995). Au niveau du réseau trans-golgien (TGN), les vésicules immatures (ISG, *immature secretory granules*) recouvertes d'un manteau de clathrine (Molinete et al., 2000) se forment et sont ensuite maturées (figure i-9).



**Figure i-9 : Biosynthèse, maturation et transport des vésicules sécrétoires dans la cellule  $\beta$**

La transcription du gène de la préproinsuline (PPI) est régulée par de nombreux facteurs de transcription (1). Les ARNm de la PPI sont traduits dans le RE où la PPI est convertie en proinsuline (PI). La PI transite à travers l'appareil de Golgi où elle subit des modifications post-traductionnelles nécessaires à sa maturation (2). A la sortie du réseau trans-golgien, la PI est stockée dans des vésicules immatures (ISG) recouvertes de clathrine (3). Les ISG transitent vers la membrane plasmique le long des microtubules et subissent des modifications de pH aboutissant à des vésicules matures (LDCV) contenant l'insuline sous forme cristallisée (4) et à la perte du manteau de clathrine. Les LDCV se fixent à proximité de la membrane plasmique grâce au réseau sous cortical d'actine (5). Suite à une stimulation calcique, l'exocytose des LDCV est déclenchée (6). Les vésicules sont alors recyclées par endocytose via la voie des puits recouverts de clathrine vers les endosomes (7) puis vers l'appareil de Golgi (8). Les vésicules de type synaptique (SLMV) bourgeonnent à partir de l'appareil de Golgi, subissent une sécrétion régulée et peuvent être recyclées indépendamment de l'appareil de Golgi (9). D'autres vésicules sont formées à partir de l'appareil de Golgi et sont sécrétées de manière constitutive, ce sont les vésicules de la sécrétion constitutive (10).

## 2. Maturation des vésicules et adressage de la protéine

La maturation des vésicules passe par une étape d'acidification indispensable à la conversion de la proinsuline en insuline. Une pompe à protons  $H^+$ -ATPase est localisée sur les vésicules, et permet l'acidification progressive de la lumière des vésicules. Lorsque le pH se situe à environ 5, les enzymes de conversion, carboxypeptidase H et l'enzyme de conversion PC (*proinsulin-conversion-endoprotease*) sont activées et clivent le peptide C de la proinsuline pour la convertir en insuline (Molinete et al., 2000). La présence d'ions  $Zn^{2+}$  ainsi que l'acidité du milieu entraînent la cristallisation de l'hormone (Dodson and Steiner, 1998). Ces cristaux sont denses aux électrons et rendent ces structures visibles en microscopie électronique à transmission. De ce fait, les granules matures sont appelés « Vésicules Grandes à Cœur Dense » (VLCD ou LDCV pour *large dense-core-vesicle*) (Burgoyne and Morgan, 2003). Parallèlement aux modifications post-traductionnelles de l'hormone, les vésicules perdent leur manteau de clathrine (Kakhlon et al., 2006).

Le transport des vésicules sur les microtubules vers le site de libération est assuré par l'ATPase kinésine, considérée comme le moteur de ce mouvement. Une fois à proximité de la membrane plasmique, les vésicules sont bloquées par le réseau sous-cortical d'actine. Lors d'une stimulation par le glucose, la kinésine est activée, permettant le recrutement des vésicules le long des microtubules au site de libération (Balczon et al., 1992; Donelan et al., 2002; Meng et al., 1997; Rorsman and Renstrom, 2003). La dépolymérisation de l'actine permet également la progression des vésicules matures vers le site d'exocytose (Li et al., 1994).

### B. Les vésicules du transport post-golgien dans la cellule $\beta$

Différentes vésicules sont localisées dans la cellule  $\beta$  : les vésicules du transport constitutif, les vésicules de type synaptique qui contiennent entre autre le GABA, les vésicules d'endocytose et les granules sécrétoires contenant l'insuline (figure i-9). Toutes ces vésicules subissent un trafic vésiculaire et des mécanismes de fusion membranaire qui nécessitent l'intervention de protéines communes. Suite à l'exocytose des vésicules, un mécanisme d'endocytose est souvent associé pour permettre le recyclage de la membrane plasmique et des composants vésiculaires.

### **1. Les vésicules du transport constitutif**

Comme nous l'avons vu précédemment, ces vésicules ne sont pas soumises à une sécrétion régulée et leur trafic permet de renouveler les lipides ou les protéines de la membrane plasmique, et de sécréter les protéines de la matrice extracellulaire (figure i-9). Peu de données sont connues à l'heure actuelle sur les mécanismes de cette sécrétion.

### **2. Les microvésicules de type synaptique (SLMV)**

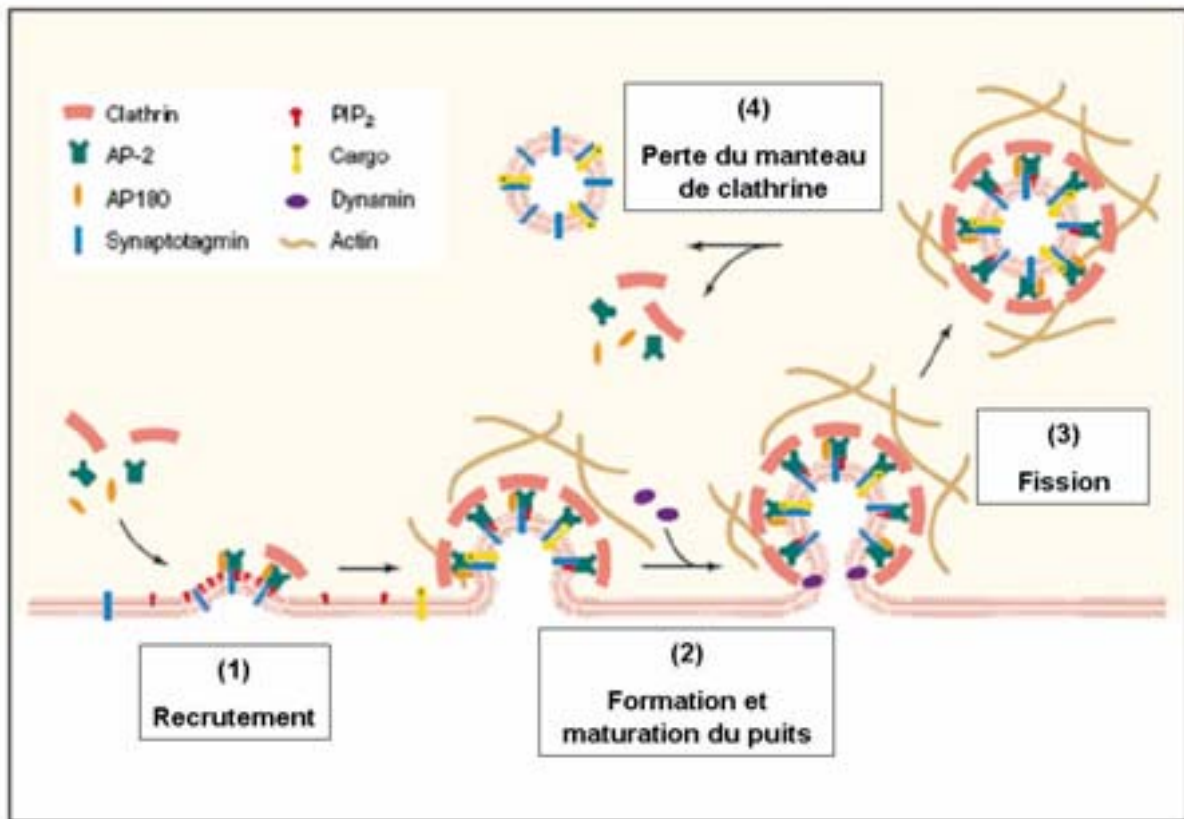
Les microvésicules de type synaptique (SLMV, *synaptic like microvesicles*) sont des vésicules de plus petite taille que les LDCV. Suivant les auteurs, leur diamètre varie de 50 à 90 nm et leur nombre dans une cellule  $\beta$  est de l'ordre de 3 500 vésicules (Braun et al., 2004). Les cellules  $\beta$  ont une origine endodermique probablement commune avec les neurones (Madsen et al., 1996), ce qui expliquerait la ressemblance entre les SLMV et les vésicules synaptiques des neurones. Ces vésicules portent à leur surface de nombreuses protéines de type neuronal, comme la synaptophysine/SVP38, qui constitue un marqueur spécifique de ce compartiment. Dans la cellule  $\beta$ , les SLMV contiennent essentiellement le GABA (Reetz et al., 1991). Ce dernier exerce une régulation autocrine inhibitrice sur la sécrétion d'insuline. La sécrétion de ces vésicules se fait de manière régulée suite à un influx calcique (Braun et al., 2004). Après la libération de leur contenu, ces vésicules peuvent être recyclées indépendamment de l'appareil de Golgi (Mundigl et al., 1993). Le remplissage de la vésicule en GABA se fait de manière concomitante à sa synthèse par la L-glutamate décarboxylase (GAD) grâce au transporteur vésiculaire VGAT (*vesicular GABA transporter*) (Gerber and Sudhof, 2002).

### **3. Les vésicules d'endocytose**

L'exocytose est généralement couplée à des phénomènes d'endocytose. En effet, la cellule doit régulièrement recycler les lipides et les protéines des vésicules d'exocytose. Deux grands types d'endocytose sont connus : la voie dépendante de la clathrine, dite des « puits recouverts de clathrine » et une voie indépendante de la clathrine, qui a été moins étudiée.

La clathrine présente une structure particulière appelée triskelion (composée de trois chaînes légères et trois chaînes lourdes). Elle est capable de s'oligomériser pour former des structures dites en « ballon de basket ». Le recrutement des unités de clathrine au niveau des





**Figure i-10 : Mécanisme d'endocytose**

La présence de certains composants de la membrane plasmique (synaptotagmine et PIP<sub>2</sub>) permet le recrutement (1) des protéines cytosoliques telles que l'AP-2 et l'AP180 qui vont servir d'ancrage à la clathrine. Le manteau de clathrine se forme et une protéine membranaire est recrutée, la protéine Cargo. La vésicule commence à s'invaginer et un réseau d'actine se forme autour du manteau de clathrine (2). L'intervention de la dynamine permet la fusion de la membrane plasmique et la libération (3) de la vésicule d'endocytose. Les protéines formant le manteau de la vésicule sont alors recyclées (4).

Adapté de (Takei and Haucke, 2001)



zones d'endocytose nécessite la présence d'adaptateurs, dont la plus connue est la protéine hétérotétramérique AP-2 (*adaptor protein-2*) (Mousavi et al., 2004).

L'AP2 est un gros complexe protéique composé de quatre sous-unités nommées  $\alpha$ ,  $\beta$ 2,  $\mu$ 2,  $\delta$ 2. La sous-unité  $\alpha$  est responsable de la fixation de l'AP2 sur des récepteurs au niveau de la membrane plasmique. La sous-unité  $\beta$ 2 possède deux sites nécessaires à la liaison entre l'AP2 et la clathrine, alors que la sous-unité  $\mu$ 2 est impliquée dans la sélection des protéines cargos. La petite sous-unité  $\delta$ 2 intervient dans la stabilité du complexe AP.

Le matériel à internaliser est concentré au niveau d'une zone précise de la membrane plasmique, riche en PIP<sub>2</sub> (Takei and Haucke, 2001), où les adaptateurs se fixent par reconnaissance, à des récepteurs spécifiques (figure i-10). D'autres molécules, les synaptotagmines ont été suggérées pour intervenir dans le recrutement de l'AP2 à la membrane plasmique. Les synaptotagmines sont des protéines transmembranaires contenant deux domaines de fixation du Ca<sup>2+</sup>, les domaines C2A et C2B. La synaptotagmine 1 peut lier avec une forte affinité les sous-unités  $\alpha$  et  $\mu$ 2 de l'adaptateur AP2 via son domaine C2B (Mousavi et al., 2004).

Les unités de clathrine sont recrutées et une cage se forme autour de la vésicule naissante. L'élongation du puits nécessite plusieurs facteurs, parmi lesquels la courbure de la membrane qui peut être influencée par la composition lipidique. En effet, la proportion relative entre la tête hydrophile et la partie hydrophobe d'un lipide peut induire une courbure de la membrane, facilitant ainsi la formation du puits (Takei and Haucke, 2001; Wenk and De Camilli, 2004). La dynamine est une GTPase de haute masse moléculaire capable de resserrer le puits de clathrine. Il existe plusieurs isoformes de la dynamine dont l'expression est spécifique du tissu. La dynamine II est exprimée de manière ubiquitaire alors que la dynamine I est essentiellement exprimée dans le cerveau et la dynamine III dans les testicules. L'ensemble de ces mécanismes conduit à une vésicule libre d'endocytose recouverte de clathrine. Rapidement, le manteau de clathrine se détache de la vésicule grâce à l'action de protéines chaperonnes. Classiquement, la vésicule est dirigée vers l'appareil endo-lysosomal puis recyclée vers l'appareil de Golgi. Néanmoins, des travaux réalisés dans une lignée MIN6 dérivant de cellules  $\beta$ , ont montré le recyclage d'une protéine appartenant aux vésicules larges à cœur dense, la phogrine. Suite à l'exocytose stimulée, la phogrine endogène est recyclée dans des vésicules immatures d'insuline par l'intermédiaire d'un compartiment endosomal sans passer par l'appareil de Golgi (Vo et al., 2004). Ceci indique que toutes les vésicules

d'endocytose n'ont pas le même devenir et qu'il existe plusieurs voies de recyclage des vésicules.

#### **4. Les granules sécrétoires ou vésicules larges à cœur dense (LDCV)**

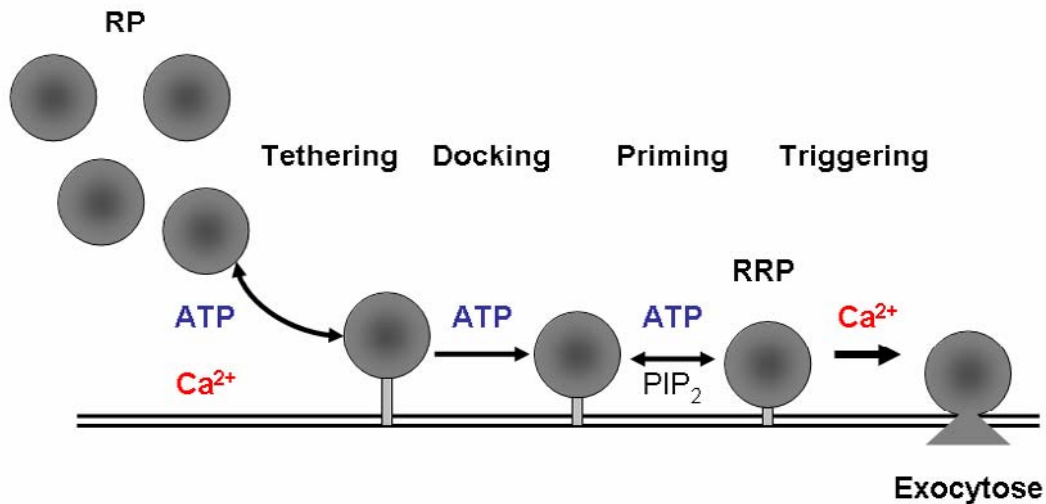
Les granules sécrétoires matures contiennent l'insuline cristallisée. Leur diamètre varie de 100 à 300 nm selon les auteurs (Barg et al., 2002; Olofsson et al., 2002). Comme nous l'avons précédemment abordé (Partie I, chapitre C), les granules sécrétoires peuvent être divisés en trois groupes distincts : un pool de réserve (RP) représentant 95 à 99 % des granules, un pool de vésicules rapidement libérables (RRP) correspondant à 1-5 % du stock total de vésicules (Rorsman and Renstrom, 2003) et un pool minoritaire correspondant à 1/10<sup>ème</sup> du stock RRP, le pool HCSP. Une cellule  $\beta$  contient environ 10 000 granules d'insuline et un granule peut libérer jusqu'à  $1,6 \cdot 10^{-18}$  mole d'insuline ( $\sim 10 \cdot 10^5$  molécules). Dans les lignées insulino-sécrétoires telles que les cellules MIN6 et INS-1, le nombre de vésicules correspond à 1/5<sup>ème</sup> du stock de vésicules dans les cellules  $\beta$  primaires ( $\sim 2000$  granules). Ces vésicules fusionnent avec la membrane plasmique suite à une augmentation de la concentration calcique intracellulaire. Cependant, les vésicules pouvant fusionner sous l'effet de ce stimulus doivent être préattachées à la membrane et être compétentes à la fusion.

#### **C. Les événements menant à la fusion régulée à la membrane plasmique**

La capacité de réponse adéquate de la cellule à une stimulation dépend, entre autres, de son stock de vésicules prêtes à être libérées. Le recrutement des vésicules vers leur site d'exocytose, les étapes d'ancrage et l'acquisition de leur compétence à la fusion ont été étudiées par différentes techniques : biochimiques, microscopiques et électrophysiologiques. Toutefois, les bases moléculaires de ces étapes ne sont que partiellement élucidées. De grandes avancées ont été réalisées grâce à l'utilisation de cellules perméabilisées. La Streptolysine-O est une toxine produite par *Streptococcus pyogenes* qui s'insère dans la membrane plasmique, s'associe en complexe et forme des pores de grande taille ( $\sim 30$  nm de diamètre), ce qui permet de diluer le cytosol et de contrôler sa composition (ATP,  $\text{Ca}^{2+}$ , etc).

Dans la littérature, la dénomination des différentes étapes menant à l'exocytose peut varier. En fonction des méthodes d'études utilisées et des auteurs, les étapes décrites reflètent





**Figure i-11 : Evénements vésiculaires menant à la fusion**

L'étape de *tethering* permet aux vésicules matures du pool de réserve (RP) de se rapprocher et d'être physiquement liées à la membrane plasmique. Cette première étape de reconnaissance est réversible et nécessite un apport d'ATP et de calcium. Les vésicules ainsi accrochées vont subir plusieurs modifications biochimiques nécessitant l'ATP (*docking*). Cette étape permet de rapprocher la vésicule de la membrane plasmique. L'étape de *priming* amène les vésicules à un état de fixation stable à la membrane plasmique. Ces événements sont dépendants d'une source d'énergie (ATP) et de la présence des PIP<sub>2</sub> dans la membrane plasmique. Les vésicules (RRP) sont alors prêtes à fusionner avec la membrane plasmique sous l'influence d'une entrée de calcium, stimulus déclencheur de la fusion (*triggering*).

des observations morphologiques ou fonctionnelles parfois qualifiées par le même nom (figure i-11).

### **1. Accrochage des vésicules (*tethering*)**

La notion de *tethering* est issue des études biochimiques des mécanismes moléculaires de la fusion membranaire dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Waters and Hughson, 2000). Les vésicules sont amenées à la proximité de la membrane plasmique au niveau de zones dites « actives » où elles seront attachées physiquement à la membrane cible. Cette étape d'accrochage des vésicules est une étape réversible.

L'*exocyst* (ou complexe sec6/8) est un complexe multimérique d'environ 730 kDa, qui joue un rôle important dans cette étape d'accrochage des vésicules à la membrane plasmique. En effet, ce complexe est exprimé de façon ubiquitaire et retrouvé chez beaucoup d'espèces, de la levure aux mammifères (Hsu et al., 1999). Dans les neurones, l'*exocyst* est ancré à la membrane et impliqué dans les phénomènes de neuroexocytose et d'expansion du cône de croissance. Récemment, les différents composants du complexe dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques ont été localisés sur les LDCV ou sur la membrane plasmique. De plus, l'utilisation de constructions tronquées des composants du complexe inhibe la sécrétion d'insuline (Tsuboi et al., 2005).

Les petites GTPases Rab (de la famille des Ras) pourraient être également impliquées dans cette étape. Les protéines Rab permettraient la reconnaissance de la membrane cible par la vésicule par un mécanisme partiellement connu qui sera détaillé plus loin (Schimmoller et al., 1998). Au niveau des cellules  $\beta$ -pancréatiques, l'isoforme Rab27a semble être impliquée dans le recrutement des granules d'insuline. Rab3 pourrait aussi être une des isoformes impliquées dans les neurones.

Cette étape de *tethering* amène la vésicule à proximité de la membrane cible, et aboutit à des vésicules accrochées physiquement de manière réversible à la membrane plasmique.

### **2. Amarrage des vésicules (*docking*)**

Les études morphologiques réalisées sur des cellules  $\beta$  ont mis en évidence une population de vésicules très proche de la membrane plasmique, à une distance inférieure au diamètre de la vésicule (Olofsson et al., 2002). Ces vésicules sont dites amarrées à la

membrane plasmique de manière irréversible. Sur environ 9 000 granules sécrétoires que compte une cellule  $\beta$ , environ 600 (7 %) sont morphologiquement amarrés mais seulement 200 granules sont exocytés suite à une stimulation par le KCl, ce qui correspond au pool RRP. Les RRP constituent donc probablement un sous-ensemble des vésicules amarrées (Olofsson et al., 2002). De plus, seule une stimulation par le glucose permet de renouveler le stock de RRP à partir des vésicules amarrées, ce qui suggère la nécessité de modifications chimiques des granules dépendantes de l'ATP.

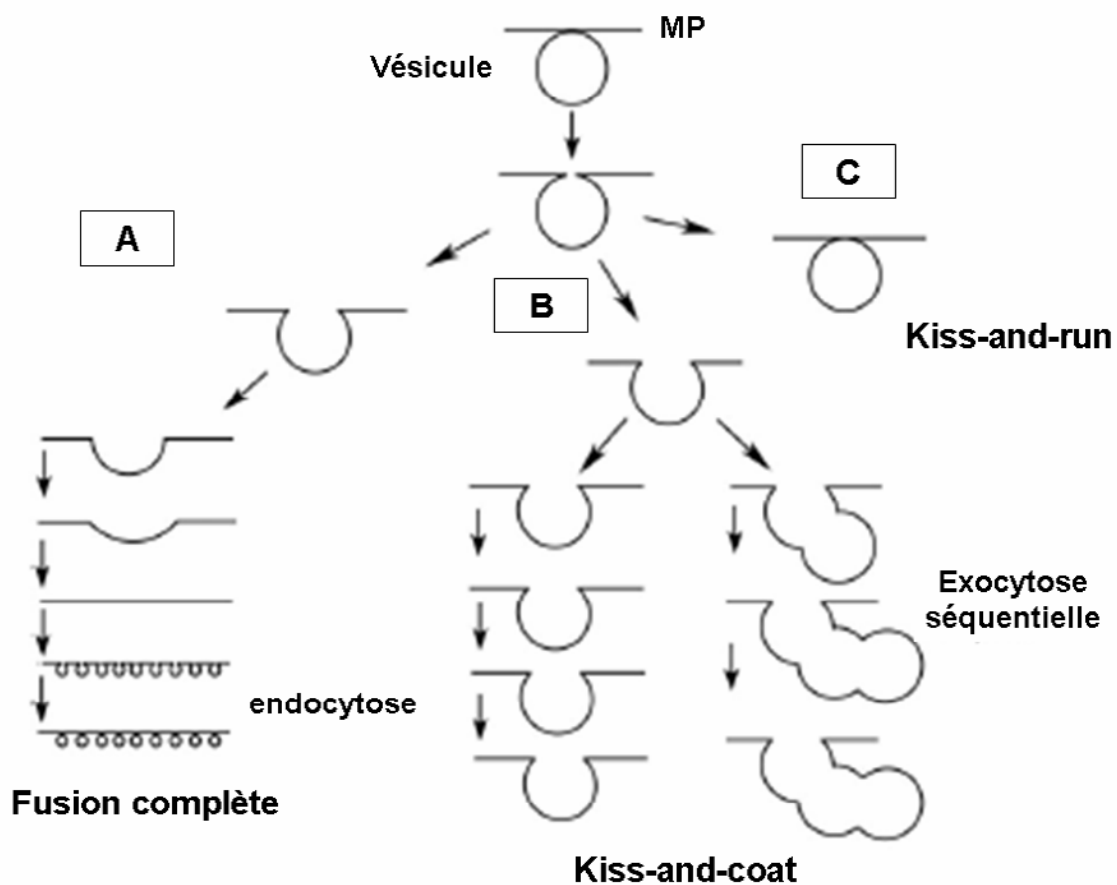
### 3. Fixation des vésicules (*priming*)

Les mesures de capacitance ont montré que l'exocytose des RRP (première phase) ne nécessite pas de couplage au métabolisme alors que la deuxième phase de sécrétion est ATP-dépendante. Ce besoin reflète la nécessité du *priming* lors de la seconde phase. En analysant de manière plus précise cette seconde phase de sécrétion, certains travaux ont pu caractériser deux étapes successives, l'une ATP-dépendante (le *priming*) et l'autre calcium-dépendante (le *triggering*) (Hay and Martin, 1992; Holz et al., 1989).

Le *priming* est une étape réversible qui permet de rendre les vésicules compétentes à la fusion, étape dite de maturation des granules de sécrétion. Elle nécessite de nombreux facteurs cytosoliques (Grishanin et al., 2004; Klenchin and Martin, 2000).

Les phosphatidylinositol phosphates (PIP) ont été identifiés comme étant impliqués dans de nombreuses réactions du trafic vésiculaire, telles que l'exocytose des vésicules synaptiques, le trafic à partir du réticulum endoplasmique, et dans le *priming* des LDCV (Lang, 2003). Les PIP sont des lipides possédant un sucre inositol qui peut être phosphorylé sur plusieurs positions. La phosphatidylinositol 4 kinase ajoute un phosphate sur la position 4 pour donner le phosphatidylinositol-4-phosphate (PI(4)P). La phosphatidylinositol-4-phosphate 5 kinase ajoute un phosphate au PI(4)P sur la position 5, pour donner le phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) (Holz and Axelrod, 2002). Chaque classe de PIP kinase contient différentes isoenzymes avec des localisations sub-cellulaires différentes. Dans des cellules chromaffines perméabilisées, l'ajout intracellulaire des PI(4)P et PI(4,5)P<sub>2</sub> (PIP<sub>2</sub>) déclenche et augmente considérablement l'exocytose par augmentation du pool RRP (Eberhard et al., 1990; Milosevic et al., 2005). De plus, l'ajout d'un anticorps dirigé contre un de ces deux lipides inhibe le réapprovisionnement du stock RRP (Olsen et al., 2003). Les PIP sont donc nécessaires à la sécrétion régulée, et ce de manière indépendante de la synthèse des seconds messagers IP<sub>3</sub> et DAG via la PLC (Eberhard et al., 1990). De plus, la





**Figure i-12 : Les différents modèles de fusion de la vésicule avec la membrane plasmique**

**A-** Modèle de fusion complète des vésicules avec la membrane plasmique. Les vésicules s'attachent et forment un pore de fusion avec la membrane plasmique. Le pore de fusion se dilate et tout le contenu de la vésicule est libéré. L'excès de membrane plasmique est ensuite recyclé par endocytose.

**B-** Modèle de fusion intermédiaire, le *kiss-and-coat*. Le pore de fusion se dilate et les vésicules restent physiquement accrochées à la membrane aboutissant à la libération totale du contenu de la vésicule. Ce modèle propose aussi la possibilité d'une exocytose séquentielle permettant la fusion d'une vésicule à une vésicule déjà fusionnée à la membrane plasmique.

**C-** Modèle de fusion *kiss-and-run*. Ce mode de fusion n'inclue pas la dilatation du pore de fusion. Les vésicules se collent à la membrane plasmique et forment un pore de fusion de faible diamètre permettant de libérer une petite partie du contenu. Puis, rapidement le pore de fusion se referme.

Adapté de (Sokac and Bement, 2006)



PI(4)P kinase est un facteur cytosolique nécessaire au priming des LDCV dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques (Olsen et al., 2003).

D'après des travaux utilisant des mutants réalisés chez la levure, l'hypothèse proposée est que les PIP<sub>2</sub> interviendraient préférentiellement dans l'endocytose. Ces phospholipides permettraient de recruter essentiellement les membres de la machinerie d'endocytose (Audhya et al., 2000), plutôt que les protéines nécessaires à l'exocytose. Cependant, plusieurs protéines liant les PIP<sub>2</sub> jouent un rôle important dans l'exocytose, comme les granophilines ou les synaptotagmines, que nous détaillerons plus loin. Il semble donc que les PIP<sub>2</sub> interviennent dans les deux mécanismes vésiculaires.

Suite à l'étape lente de *priming* ATP-dépendante, l'étape finale de fusion, *triggering*, est déclenchée par l'entrée de calcium à travers les canaux calcium voltage-dépendants de type L.

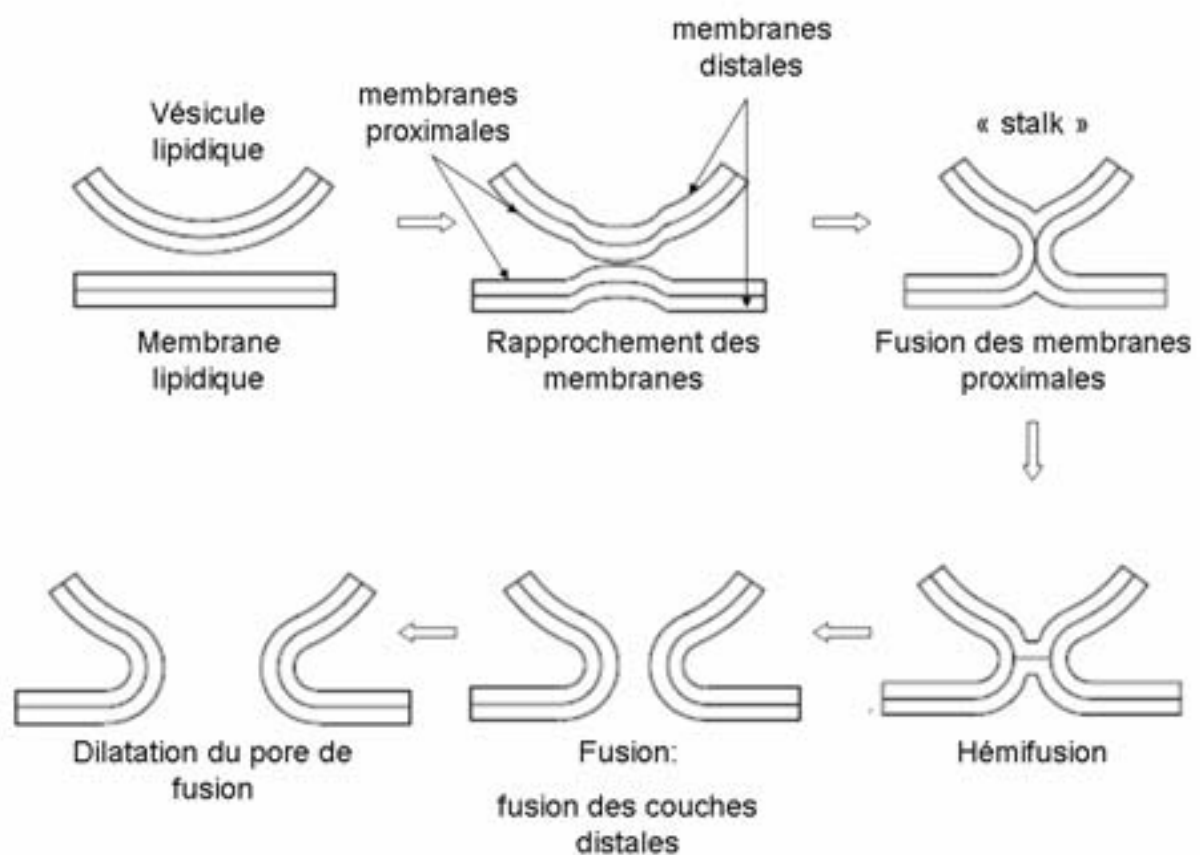
## **D. La fusion membranaire**

### **1. Fusion complète ou incomplète**

La fusion régulée des granules sécrétoires avec la membrane plasmique peut se faire selon trois types de fusion : la fusion complète, la fusion transitoire appelée *kiss-and-run*, ou encore la fusion nouvellement décrite nommée *kiss-and-Coat* (figure i-12).

Le modèle de fusion complète est le plus ancien et le plus repris dans la littérature. Selon ce modèle, une vésicule fusionne totalement avec la membrane plasmique en libérant l'intégralité de son contenu. L'apport de membrane sera compensé par endocytose via la voie clathrine-dépendante ou clathrine-indépendante (Burgoyne and Morgan, 2003; Rorsman and Renstrom, 2003; Sokac and Bement, 2006).

Le second modèle a été mis en évidence morphologiquement au niveau de la jonction neuromusculaire de la grenouille (Ceccarelli et al., 1973). Puis, il a été caractérisé par des techniques combinées, de mesure de la conductance du pore de fusion (technique du patch-clamp) et de la libération des catécholamines sécrétées (technique d'ampérométrie). Dans ce modèle, la vésicule fusionne partiellement avec la membrane plasmique en créant un pore de diamètre compris entre 1 et 5 nm, permettant la libération d'une partie du contenu (Rorsman and Renstrom, 2003). Rapidement le pore est refermé et la vésicule se détache de la membrane. Ce mécanisme d'exocytose est très rapide, inférieur à 1 seconde.



**Figure i-13 : Modèle de fusion *in vitro* de deux membranes lipidiques**

La fusion entre deux membranes exclusivement lipidiques se fait selon « l'hypothèse stalk ». Les deux membranes phospholipidiques se rapprochent et les couches proximales peuvent fusionner amenant à un intermédiaire de fusion appelé « stalk ». Ensuite les couches distales fusionnent partiellement (stade d'hémifusion) et la fusion totale des deux bicouches se réalise. Une fois le pore de fusion créé, son diamètre peut augmenter.

Adapté de (Rizo et al., 2006)

Dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques, en considérant la nature cristalline de l'insuline dans les LDCV et les observations en microscopie électronique, il semble difficile d'envisager le mode de fusion partielle. L'équipe de Patrick Rorsman a proposé un modèle intermédiaire, basé sur le suivi du cargo fluorescent des LDCV et des mesures électrophysiologiques. Ce modèle correspond à l'ouverture d'un pore étroit (<1 nm), permettant la libération des petites molécules. Puis, dans un second temps, le pore de fusion s'agrandit (>12 nm) et le contenu cristallin peut être libéré. Cette équipe considère que 90 % des événements de fusion se font selon ce mode (Rorsman and Renstrom, 2003). Néanmoins, ces observations pourraient correspondre à un artefact dû à l'utilisation même des marqueurs fluorescents (Michael et al., 2004).

Récemment, une autre équipe a proposé un modèle de fusion qui semble être compatible avec le modèle de fusion intermédiaire proposé par P. Rorsman. Dans ce modèle, la vésicule forme un pore qui se dilate pour atteindre un diamètre 2 à 3 fois plus grand (~ 15 nm). Le pore est ainsi maintenu pendant plusieurs secondes et un manteau d'actine se forme autour de la vésicule de sécrétion afin de stabiliser la fusion (Sokac and Bement, 2006). Des études ont montré que certaines vésicules d'exocytose étaient recouvertes d'un réseau d'actine, comme par exemple les granules de sécrétion du zymogène dans les acini pancréatiques (Nemoto et al., 2004). Ainsi cette sécrétion peut durer très longtemps allant jusqu'à 30 minutes dans le cas de l'exocytose dans les cellules alvéolaires de type II. Ce mode de sécrétion permet également une exocytose séquentielle (figure i-12). Une seconde vésicule vient fusionner avec la première vésicule déjà fusionnée à la membrane plasmique, et ainsi de suite. Cependant, cette voie d'exocytose reste encore incertaine et il apparaît assez difficile de distinguer clairement des vésicules d'exocytose qui fusionnent par ce mode de fusion et des pré-vésicules d'endocytose.

En effet, l'exocytose complète (figure i-12 modèle A) semble être le cas le plus courant dans les cellules  $\beta$ .

## **2. Le pore de fusion : lipidique ou protéique ?**

La fusion de la vésicule avec la membrane plasmique nécessite la formation d'un pore de fusion. La nature biophysique exacte du pore de fusion n'est pas clairement établie.

D'un point de vue physico-chimique, la fusion de bicouches lipidiques dans un environnement aqueux se fait en deux étapes selon « l'hypothèse stalk » (figure i-13). Dans

un premier temps, les forces électrostatiques de répulsion sont vaincues et les deux membranes phospholipidiques se rapprochent pour être en contact. Les zones hydrophobes des bicouches sont déstabilisées permettant ainsi la fusion des couches proximales de phospholipides et l'obtention d'un intermédiaire de fusion appelé « stalk » (tige). Par la suite, la fusion partielle des couches distales se produit et on obtient le stade d'hémifusion. Puis les deux couches distales fusionnent complètement, entraînant l'ouverture du pore aqueux entre les deux membranes (Jahn et al., 2003).

La constitution du pore de fusion n'est pas clairement définie, et la présence ou non de protéines formant le pore est envisageable. Effectivement, chez la levure, les sous-unités Vo de l'ATPase vacuolaire à protons peuvent s'associer et former un complexe participant à la formation d'un pore protéique au cours de la fusion vacuolaire de la levure (Bayer et al., 2003). De plus, la participation de protéines membranaires, les protéines SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor attachment protein receptors*), à la formation du pore de fusion par leur association en complexe, est envisageable (Mayer, 2001). Des mutations au niveau du domaine transmembranaire d'une des protéines SNARE, la syntaxine, induisent des altérations du flux du pore de fusion. Ces observations ont été interprétées de manière qu'un anneau de cinq à huit segments transmembranaires de la syntaxine peuvent former un pore de fusion protéique (Han et al., 2004b).

Quelle que soit la nature biophysique du pore de fusion, lipidique, protéique ou un mélange protéolipidique, de nombreux facteurs influencent l'ouverture du pore. Parmi ces régulateurs, nombreux sont ceux qui régulent la formation du complexe SNARE tels que les synaptotagmines, la complexine, la Csp (*Cystein string protein*) ou Munc-18.

## **E. Les acteurs moléculaires de la fusion membranaire**

### **1. Le complexe SNARE**

#### 1.1. Découverte du complexe

Dans les années 70, les premières études destinées à cerner les mécanismes moléculaires de l'exocytose portaient sur l'étude de mutants thermosensibles de la levure *Saccharomyces cerevisiae* incapables de sécréter. Ces études ont conduit à l'identification du premier gène impliqué dans le trafic post-golgien et l'exocytose, le gène *sec-1* (Novick and

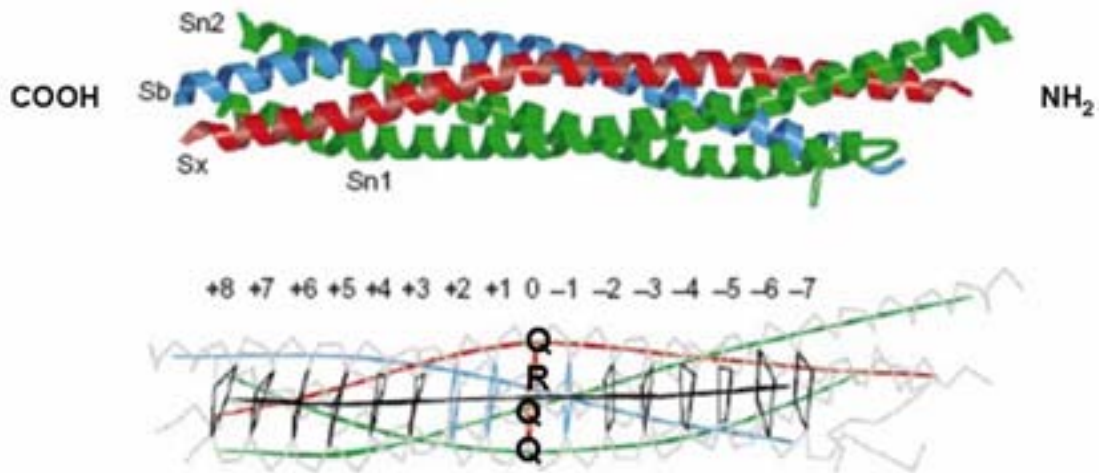
Schekman, 1979). Par la suite, le criblage de clones a permis d'identifier 23 gènes sec impliqués dans ce processus (Novick et al., 1980).

Parallèlement, des études biochimiques basées sur l'inhibition du trafic golgien par le NEM (N-éthylmaléimide) ont mis en évidence le rôle de l'ATPase cytosolique NSF (*NEM-sensitive fusion protein*) dans ce trafic (Block et al., 1988). Par la suite, des protéines cytosoliques liant le NSF ont été caractérisées, ce sont les protéines SNAP (*soluble NSF-attachment protein*) (Clary et al., 1990). Ces protéines très conservées au cours de l'évolution, sont impliquées dans le trafic golgien et post-golgien. Les récepteurs membranaires du complexe NSF/SNAP, ont été caractérisés grâce à des chromatographies d'affinité pour le NSF. Ces protéines ont été appelées les protéines SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor attachment protein receptors*). L'homologie de séquence entre toutes les protéines de levure impliquées dans les défauts de transport des mutants sec et les protéines SNARE a abouti à la notion de complexe universel pour la fusion membranaire (Burgoyne and Morgan, 2003).

L'étude des protéines SNARE a fortement progressé grâce à l'utilisation des neurotoxines clostridiales. Le tétanos et le botulisme sont des maladies bactériennes graves qui se caractérisent par un blocage synaptique total au niveau des jonctions neuromusculaires (Niemann et al., 1994). Les cibles moléculaires de ces toxines ont été identifiées comme étant les protéines SNARE. La toxine tétanique (TetX) est responsable du clivage spécifique de VAMP2 (*vesicle-associated membrane protein*) (Link et al., 1994). Les neurotoxines botuliques (BoNT) présentent une spécificité plus vaste selon leur sérotype : BoNT/C clive spécifiquement la syntaxine 1, BoNT/A et BoNT/E coupent SNAP-25 (*Synaptosomal-associated protein of 25 kDa*) sur des sites distincts (Binz et al., 1994). La coupure des SNARE par ces toxines induit l'inhibition de la neuroexocytose (Blasi et al., 1994; Sakaba et al., 2005; Schiavo et al., 1992) et de l'exocytose de l'insuline dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques (Lang et al., 1997b). Au laboratoire, nous utilisons des constructions plasmidiques qui permettent d'exprimer transitoirement dans les cellules la chaîne légère de la toxine qui porte l'activité catalytique (Lang et al., 1997b).

## 1.2. Description et caractéristiques du complexe SNARE

Les protéines SNARE sont des protéines extrêmement conservées dans les règnes animal et végétal. Des études *in vitro* suggèrent que le complexe SNARE constitue la machinerie minimale de fusion (Burgoyne and Morgan, 2003). Ces protéines forment une grande famille comprenant 24 membres chez la levure et 35 chez les mammifères (Bock et al.,



**Figure i-14 : Structure du complexe SNARE**

La structure du complexe SNARE formé par les parties solubles des protéines SNARE est représentée ci-dessus d'après des données cristallographiques. La syntaxine (Sx) est schématisée en rouge, la synaptobrevine ou VAMP (Sb) en bleu et les deux hélices  $\alpha$  de SNAP-25 (Sn1 et Sn2) en vert. L'organisation du complexe SNARE peut se représenter en 16 couches successives de -7 à +8, avec au centre la couche 0, qui contient les résidus glutamine (Q) et le résidu arginine (R). L'axe de la super hélice est tracé en noir et le squelette carboné de chaque hélice est schématisé en gris.

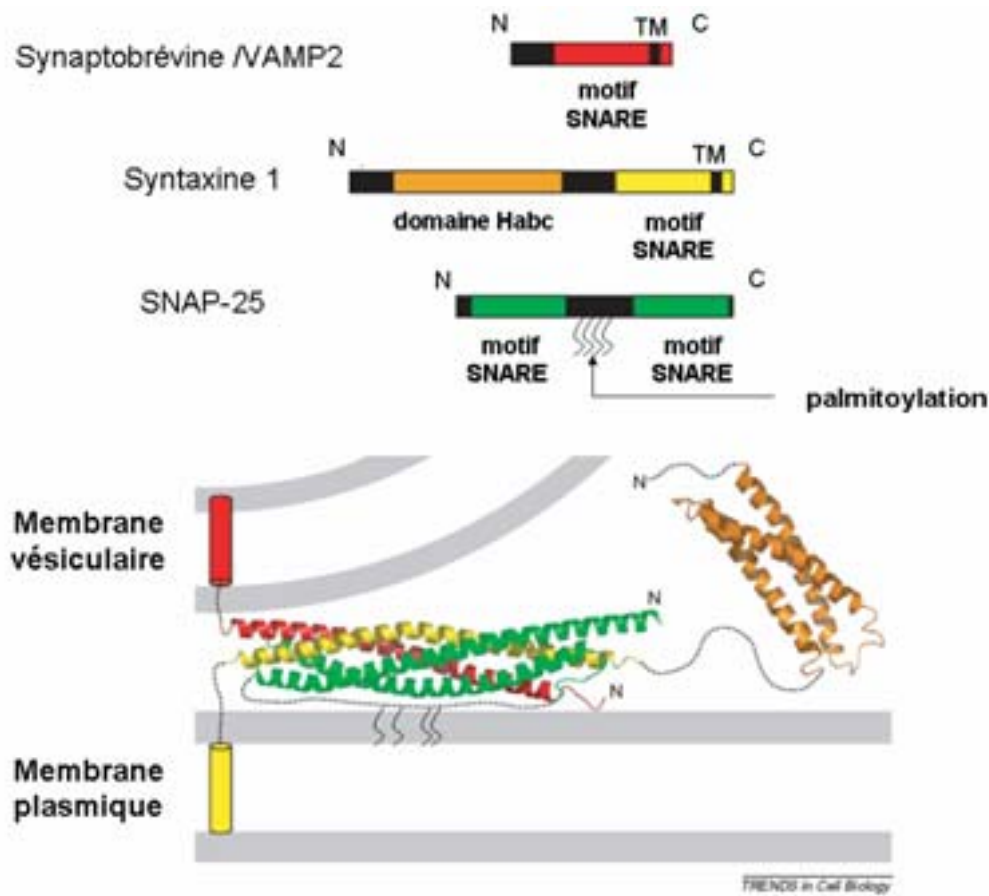
Adapté de (Sutton et al., 1998)

2001). Tous les membres de cette famille portent un domaine commun de 60 acides aminés, appelé le motif SNARE, dont la structure tridimensionnelle est une hélice  $\alpha$ . Quatre motifs SNARE dont deux proviennent de la protéine SNAP-25, un de la protéine VAMP et le dernier de la syntaxine, peuvent s'associer et former une structure surenroulée en « super hélice », appelée le complexe SNARE (figure i-14). La structure des parties cytosoliques de ce complexe a été résolue par cristallographie et diffraction des rayons X (Sutton et al., 1998) ainsi qu'en solution par RMN (résonance magnétique nucléaire) (Fiebig et al., 1999) et est schématisée sur la figure i-14. Le complexe SNARE formé est une structure très stable qui résiste à la dénaturation par le détergent anionique SDS, et à la chaleur (sa température de fusion est de 70°C).

Il existe deux grandes catégories de SNARE, les v-SNARE (*vesicular-SNARE*) portées par la membrane de la vésicule, et les t-SNARE (*target-SNARE*) portées par la membrane cible (par exemple la membrane plasmique dans le cas des granules sécrétoires). Les v-SNARE et les t-SNARE apportent ensemble les 4 hélices  $\alpha$  nécessaires à la formation du complexe trimérique SNARE. L'organisation des trois protéines SNARE en complexe se fait selon des couches successives réparties sur une longueur de 120 angströms. La couche centrale est appelée la couche 0 et on distingue 7 couches en amont (-1 à -7) et 8 couches en aval (+1 à +8) (figure i-14). Au niveau de la couche centrale 0, les t-SNARE contiennent un résidu glutamine (trois résidus glutamine apportés) et les v-SNARE contiennent une arginine (une seule arginine apportée). La conservation dans tous les complexes de cette organisation a permis de proposer une nouvelle classification : les Q-SNARE pour les protéines amenant un résidu glutamine (Q) donc les t-SNARE, et les R-SNARE pour les v-SNARE qui apportent une arginine (R). La stabilité du complexe est assurée par les liaisons électrostatiques établies entre ces quatre acides aminés au niveau de la couche 0 (figure i-14).

### 1.3. Les protéines SNARE et la sécrétion d'insuline

Lors de la fusion de la vésicule d'exocytose avec la membrane plasmique, la formation du complexe SNARE implique trois protéines appelées les protéines SNARE. Deux t-SNARE localisées sur la membrane plasmique et une v-SNARE présente sur la membrane vésiculaire. Il existe une multitude d'isoformes décrites, et cette diversité des protéines SNARE autant des v-SNARE que des t-SNARE, pourrait permettre la reconnaissance spécifique des membranes des deux compartiments qui doivent fusionner (Gerst, 2003). Lors de l'exocytose des granules



**Figure i-15 : Structure des protéines SNARE et du complexe SNARE**

Les protéines SNARE sont schématisées ci-dessus. La protéine VAMP2 (synaptobrevine), représentée en rouge, contient un motif SNARE et un domaine transmembranaire qui la localise sur la membrane vésiculaire. La syntaxine 1 comporte plusieurs domaines, le motif SNARE (en jaune), un domaine N-terminal cytosolique appelé Habc (en orange) et un domaine transmembranaire (TM) permettant sa localisation à la membrane plasmique. En vert, sont représentés les deux motifs SNARE de la SNAP-25, qui est ancrée à la membrane plasmique par des modifications post-traductionnelles (palmitoylation). Les quatre motifs SNARE forment une super-hélice qui constitue un complexe très stable capable de rapprocher les deux membranes. Les extrémités N et C terminales sont représentées pour chaque protéine.

Adapté de (Rizo et al., 2006)



sécrétoires contenant l'insuline (LDCV) dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques, les isoformes mises en jeu sont : la syntaxine 1 et la SNAP-25 (*Synaptosomal-associated protein of 25 kDa*) en tant que t-SNARE sur la membrane plasmique, et la protéine VAMP2/Synaptobrevine qui est une v-SNARE localisée sur les vésicules de sécrétion.

### 1.3.1. La syntaxine

Dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques, les isoformes 1, 2, 3, 4 et 6 de la syntaxine sont exprimées (Kang et al., 2002; Lang et al., 1997b). Les syntaxines sont des protéines transmembranaires de 35 kDa, avec une longue extrémité amino-terminale cytoplasmique (figure i-15). Dans cette extrémité N-terminale se situe un domaine appelé domaine Habc, qui forme une structure en triple hélice. Dans la partie la plus proximale à la membrane, se trouve le motif SNARE, qui se structure en hélice  $\alpha$  et participe à la formation du complexe SNARE (Brunger, 2005).

La syntaxine 1, localisée sur la membrane plasmique, est l'isoforme majoritairement impliquée dans l'exocytose des LDCV (Lang et al., 1997a) bien que la syntaxine 2 soit également présente sur la membrane plasmique. L'exposition de cellules  $\beta$  à un anticorps dirigé contre la syntaxine 1, a montré une forte inhibition de la sécrétion d'insuline (Martin et al., 1995). La syntaxine 3 semble être impliquée dans l'exocytose mais sa localisation exacte demeure controversée. Récemment l'implication de la syntaxine 4 dans la sécrétion d'insuline en réponse au glucose a été mise en évidence mais cette isoforme ne semble pas intervenir dans l'étape finale de l'exocytose (Spurlin and Thurmond, 2006). La syntaxine 6 est localisée au niveau du TGN et sur les granules immatures, et pourrait participer au trafic golgien et post-golgien des granules sécrétoires (Kuliawat et al., 2004b).

### 1.3.2. SNAP-25

Deux isoformes de SNAP sont connues et exprimées dans les cellules  $\beta$ , SNAP-25 et SNAP-23 mais seule l'isoforme SNAP-25 est impliquée dans la sécrétion d'insuline (Chieriegatti et al., 2004; Sadoul et al., 1997; Sadoul et al., 1995). L'importance de la protéine SNAP-25 dans la neurosécrétion régulée a été mise en évidence dans des souris Knock-Out (KO) pour le gène codant pour cette protéine SNARE (Washbourne et al., 2002). La protéine SNAP-25 est une protéine cytoplasmique de 25 kDa. A l'inverse des deux autres protéines

SNARE, elle est ancrée à la membrane plasmique par des groupements palmitates qui sont ajoutés de façon post-traductionnelle sur des cystéines présentes au centre de la protéine (figure i-15). Les deux parties N- et C-terminales prennent chacune une structure tridimensionnelle d'hélice  $\alpha$  (motif SNARE) qui participe à la formation du complexe SNARE (Graham et al., 2002).

### 1.3.3. VAMP

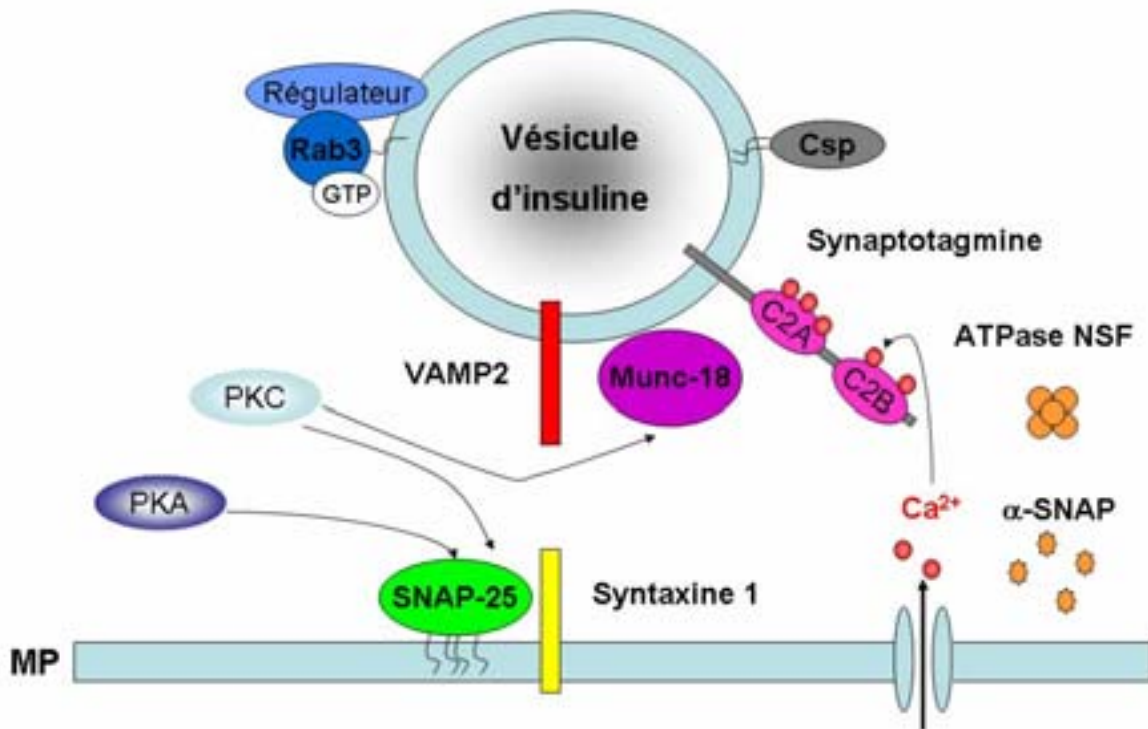
Dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques, les isoformes 2, 3 et 7 sont exprimées. Seules les protéines VAMP2 et VAMP3 sont portées sur les LDCV et SLMV et participent à la sécrétion d'insuline (Regazzi et al., 1995). L'isoforme VAMP7 appelée aussi Ti-VAMP est localisée au niveau du compartiment endo-lysosomal dans les cellules  $\beta$  (Monterrat et al., en révision). Les isoformes VAMP sont des protéines transmembranaires accrochées aux vésicules (v-SNARE), leur domaine cytosolique N-terminal porte un motif SNARE qui participe à la formation du complexe SNARE (figure i-15).

## 2. Implication du complexe SNARE dans la fusion membranaire

Plusieurs études laissent supposer que les protéines SNARE sont partiellement préassemblées (Rickman et al., 2006; Rickman et al., 2004c). An et Almers ont décrit la formation du complexe *in vivo* dans des cellules chromaffines (PC12) en utilisant une protéine SNAP-25 fluorescente. Par l'utilisation du FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfert*), ils ont observé la formation des complexes SNARE en suivant les variations de fluorescence. La syntaxine et SNAP-25 formeraient un complexe t-SNARE de forte affinité au niveau de la membrane plasmique puis VAMP2 se fixerait avec une haute affinité uniquement lorsque les deux t-SNARE seraient préassemblées (An and Almers, 2004). Ces observations sont en accord avec des études antérieures utilisant les toxines clostridiales qui montrent des interactions deux à deux des protéines SNARE (Hayashi et al., 1994).

Dans les souris KO pour le gène codant pour SNAP-25, la libération déclenchée par le calcium est réduite mais les événements d'exocytose spontanée sont nettement augmentés (Washbourne et al., 2002) alors que dans les souris KO pour le gène codant pour la syntaxine 1, l'exocytose est inhibée à 100%. En revanche, l'inactivation du gène codant pour VAMP2 dans des souris induit une diminution de 90 % de la sécrétion spontanée et une diminution





**Figure i-16 : Les régulateurs du complexe SNARE**

La formation, la stabilité et la dissociation du complexe SNARE sont des étapes extrêmement régulées. Plusieurs protéines sont impliquées dans la régulation de la formation du complexe comme la protéine Munc-18 qui bloque la formation du complexe SNARE en liant la syntaxine 1. D'autres protéines régulent le complexe SNARE mais leur mode d'action reste peu connu comme la Csp qui lie la protéine VAMP 2. Les protéines Rab tiennent un rôle dans la reconnaissance des membranes, alors que les protéines solubles NSF et α-SNAP régulent la dissociation du complexe. Les synaptotagmines sont aussi des régulateurs de la fermeture du complexe SNARE et leur action est dépendante du calcium. Enfin, deux enzymes sont majoritairement impliquées dans la régulation de l'exocytose en modulant le complexe SNARE, la PKC et la PKA qui phosphorylent certaines protéines SNARE et certains régulateurs.

plus drastique (100 fois plus) dans la sécrétion régulée par le  $\text{Ca}^{2+}$  (Schoch et al., 2001). L'importance fonctionnelle des protéines SNARE est différente ce qui suggère que lors des différentes étapes menant à la fusion (*tethering*, *docking* et *priming*), différents états d'assemblage du complexe SNARE seraient impliqués (Sakaba et al., 2005).

En effet, les mesures électrophysiologiques sont compatibles avec l'existence de deux états de stabilité du complexe SNARE. Dans un premier temps, les quatre hélices  $\alpha$  sont associées de façon incomplète formant ainsi un complexe lâche. Puis la stabilité du complexe augmenterait jusqu'à la conformation la plus stable permettant le rapprochement des deux membranes et leur fusion. Entre cette première étape de contact et la fermeture du complexe SNARE, que l'on apparente au glissement d'une fermeture éclair (*zipper*) (Mayer, 2001), de nombreuses étapes réversibles existeraient (Graham et al., 2001) et plusieurs protéines régulatrices interviendraient.

### 3. Les régulateurs du complexe SNARE et de la fusion

Le complexe SNARE étant capable d'induire à lui seul la fusion de liposomes reconstitués, il constitue le complexe minimal de fusion (Burgoyne and Morgan, 2003; Weber et al., 1998). La fusion observée nécessite plusieurs minutes et n'est donc pas strictement équivalente à des événements de fusion physiologiques de sécrétion régulée. Plusieurs régulateurs interviennent dans la formation initiale du complexe, dans sa fermeture ainsi que dans sa dissociation afin d'accélérer ce mécanisme de fusion (figure i-16).

#### 3.1. Munc-18

La protéine Munc-18 (*Mammalian uncoordinated-18*) est l'homologue de sec-1 chez la levure. Cette protéine est fortement exprimée dans le cerveau mais on la retrouve également dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques, localisée sur les LDCV où elle régule l'exocytose d'insuline. Par des techniques de spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN) (Dulubova et al., 1999; Fernandez et al., 1998), la structure de la syntaxine 1 lors de l'exocytose a été étudiée. La syntaxine 1 adopte un état conformationnel « fermé » dans lequel son domaine N-terminal ne peut pas participer à la formation du complexe SNARE. Au moment de l'exocytose, la syntaxine 1 passe en conformation « ouverte » et son motif SNARE peut être engagé dans la formation du complexe (Gerst, 2003). De nombreuses

études ont montré une interaction entre Munc-18 et le domaine Habc en N-terminal de la syntaxine proposant que cette interaction stabilise la syntaxine en conformation « fermée », évitant ainsi la fusion continue des vésicules (Dulubova et al., 1999; Graham et al., 2004; Misura et al., 2000). Munc-18 tient un rôle crucial dans le processus d'exocytose puisque les souris KO pour ce gène présentent une totale abolition de la neurosécrétion (Verhage et al., 2000).

### 3.2. La complexine

La complexine est une petite protéine cytosolique de 18 kDa. Deux isoformes hautement conservées existent, la complexine I et la complexine II qui sont exprimées de façon ubiquitaire à de faibles taux, à l'exception du cerveau où l'expression est la plus forte (McMahon et al., 1995). Cette protéine co-localise avec les protéines SNARE et se lie au complexe SNARE/Synaptotagmine (Syt).

Dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques primaires, la complexine I, isoforme majoritairement exprimée, régule la sécrétion d'insuline en réponse à une stimulation par le glucose ou par le KCl, suggérant un rôle dans les étapes tardives de l'exocytose (Abderrahmani et al., 2004).

Néanmoins, des mesures d'ampérométrie sur des cellules chromaffines ont montré que la surexpression de la complexine II inhibe les événements d'exocytose et modifie la cinétique de fusion (Archer et al., 2002). Il apparaît que la complexine par sa fixation au complexe SNARE/Syt stabiliserait une conformation intermédiaire du complexe après la fusion *kiss-and-run*.

### 3.3. Les protéines Rab

Les protéines Rab sont des petites GTPases appartenant à la famille des protéines Ras. Il existe une soixantaine d'isoformes chez les mammifères. Les protéines Rab peuvent se retrouver sous deux formes : une forme inactive, cytosolique, liée au GDP et une forme active fixée à la membrane et liée au GTP (figure i-16). Le passage entre l'état actif et l'état inactif des protéines Rab fait intervenir des régulateurs.

Dans la cellule, il existe une grande variété de types de membranes tels que la membrane plasmique et les membranes des différents compartiments sub-cellulaires. La cellule doit donc posséder un système de reconnaissance des différentes membranes lors de la fusion. La multitude d'isoformes des protéines Rab et de régulateurs font des protéines Rab le

cœur du mécanisme de reconnaissance des membranes lors de la fusion (Burgoyne and Morgan, 2003; Jahn et al., 2003).

L'isoforme Rab3a est la protéine majoritairement impliquée dans l'exocytose régulée. En effet, la surexpression de cette protéine a pour effet d'inhiber l'exocytose dans les neurones, les cellules endocrines et les cellules  $\beta$  (Burgoyne and Morgan, 2003). Dans des cellules chromaffines, le rôle coopératif des isoformes Rab3a et Rab27a a été mis en évidence par des approches d'inhibition de leur expression (ARN interférence). Ces deux protéines semblent tenir un rôle dans la régulation de l'accrochage des vésicules à la membrane plasmique (Tsuboi and Fukuda, 2006). De plus, des souris KO pour le gène codant pour la protéine Rab27a présentent une sécrétion d'insuline perturbée en réponse au glucose (Kasai et al., 2005). Néanmoins, la sécrétion stimulée par le KCl n'est pas perturbée, ce qui suggère que les étapes tardives de l'exocytose ne sont pas altérées.

#### 3.4. La Csp (*Cystein-string protein*)

La Csp est une protéine vésiculaire appartenant à la famille des co-chaperonnes, identifiée dans les neurones et les cellules endocrines (Zinsmaier and Bronk, 2001). Ces protéines sont localisées sur les vésicules synaptiques des neurones et sur les LDCV et SLMV des cellules endocrines (Zhang et al., 1998a). La Csp intervient à plusieurs étapes de l'exocytose et participe à la régulation de la sécrétion d'insuline. En effet, la surexpression de la Csp dans des lignées insulino-sécrétoires inhibe la sécrétion de l'insuline (Zhang et al., 1999; Zhang et al., 1998a). D'autres études ont montré, par des mesures d'ampérométrie, que la surexpression de la Csp dans les cellules chromaffines a deux effets distincts sur l'exocytose des LDCV. Tout d'abord, on observe une diminution du nombre d'événements de fusion. Puis, l'analyse des paramètres cinétiques des événements restants montre une augmentation du temps et de la taille d'un événement unique de libération d'un granule de sécrétion (Graham and Burgoyne, 2000). Cela reflète un ralentissement de l'événement de fusion, et peut être interprété comme une altération des étapes finales de l'exocytose. Récemment il a été montré que la protéine kinase B (PKB/Akt) phosphoryle la Csp et que l'inactivation de cette kinase a le même effet que la surexpression de la Csp (Evans et al., 2006).

Dernièrement, l'interaction entre la Csp et la protéine VAMP a été montrée dans les cellules  $\beta$  (Boal et al., 2004a). Le rôle précis de la Csp n'est pas clairement défini mais il apparaît évident que cette protéine régule les étapes tardives de l'exocytose.

### 3.5. $\alpha$ -SNAP et NSF

Après la fusion, le complexe doit se dissocier et cette étape est réalisée grâce à l'ATPase NSF et un adaptateur ( $\alpha$ -SNAP ou  $\beta$ -SNAP). L'hydrolyse de l'ATP par l'ATPase NSF induit un changement conformationnel qui déclenche le déroulement de la super hélice (Burgoyne and Morgan, 2003; Jahn et al., 2003). Cette hypothèse est renforcée par le fait que  $\alpha$ -SNAP interagit fortement avec le complexe SNARE et faiblement avec les protéines SNARE monomériques (McMahon et al., 1995). D'autre part, les modifications post-traductionnelles du NSF modulent l'activité de la protéine et régule la fusion (Morgan and Burgoyne, 2004).

### 3.6. Les kinases : PKA et PKC

L'implication de deux kinases dans la régulation de l'exocytose a été largement étudiée : la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA) et la protéine kinase  $Ca^{2+}$ -dépendante (PKC).

Munc-18 est connu pour être un substrat de la PKC (Barclay et al., 2003), et comme nous l'avons vu précédemment, Munc18 interagit avec la syntaxine pour bloquer la formation du complexe SNARE. La phosphorylation de Munc-18 par la PKC diminue son interaction avec la syntaxine et régule l'exocytose (Morgan et al., 2005). Des analyses par ampérométrie ont montré que, dans des cellules chromaffines exprimant un mutant de la protéine Munc-18 qui présente une affinité réduite vis-à-vis de la syntaxine, la vitesse de libération du contenu vésiculaire est augmentée (Fisher et al., 2001).

La protéine SNAP-25 est également un substrat des kinases PKA et PKC. Les kinases phosphorylent différemment la protéine SNAP-25. La phosphorylation par la PKC diminue l'interaction de SNAP-25 avec la syntaxine, suggérant un rôle important de la PKC dans la formation du complexe SNARE (Barclay et al., 2005; Morgan et al., 2005; Snyder et al., 2006). Des manipulations pharmacologiques couplées à des études de mutagenèse sur la machinerie d'exocytose dans des cellules chromaffines, ont montré l'importance d'une



activité constitutive de la PKA pour le maintien des vésicules du pool RRP (Nagy et al., 2004). Il semble donc que la phosphorylation de SNAP-25 par la PKA intervient dans l'étape de *priming* des vésicules.

#### **4. Le calcium et les senseurs calciques**

Le calcium est l'élément déclencheur de l'exocytose. La concentration de calcium libre dans le cytosol est maintenue au repos à environ 0,1  $\mu\text{M}$  (Burgoyne and Morgan, 2003). La dépolarisation de la membrane plasmique, due à la fermeture des canaux  $K_{\text{ATP}}$  dans les cellules  $\beta$ , induit l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants et donc une entrée d'ions calcium dans la cellule suivant un gradient électrochimique. Des données expérimentales, utilisant des chélateurs fluorescents du calcium, ont permis de déterminer la valeur maximale de calcium atteinte localement dans le cytosol au cours de la neurosécrétion. Cette valeur est aux alentours de 100  $\mu\text{M}$  (Yamada and Zucker, 1992) et la concentration moyenne permettant de déclencher l'exocytose se situerait entre 10 et 20  $\mu\text{M}$  (Bollmann et al., 2000; Schneggenburger and Neher, 2000). La sensibilité de l'exocytose au calcium implique la présence d'une protéine senseur du calcium (Burgoyne and Morgan, 1998). Deux candidats majoritaires sont décrits dans la littérature : la calmoduline et les synaptotagmines.

### III. LE CALCIUM : UN SECOND MESSAGER INTRACELLULAIRE

Le calcium est un élément essentiel à l'organisme, il intervient dans la signalisation cellulaire de plusieurs grands processus tels la prolifération, la différenciation, l'apoptose et la sécrétion. Chaque cellule régule sa concentration calcique intracellulaire pour la maintenir stable. Le calcium dans la cellule se retrouve sous deux formes, une forme liée où les ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont engagés dans des liaisons avec des molécules et une forme libre ionisée. Seule la forme libre du calcium peut intervenir dans les voies de signalisations cellulaires et la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  libre dans la cellule doit être maintenue constante et basse de l'ordre de  $0,1 \mu\text{M}$ .

#### A. Le calcium

En 1833, Sidney Ringer a été le premier à décrire un lien entre le tissu, la fonction cellulaire et le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Il démontre la nécessité du  $\text{Ca}^{2+}$  lors des contractions normales et régulières d'un cœur de grenouille isolé. Depuis, le rôle fondamental du  $\text{Ca}^{2+}$  dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que, la fécondation, la différenciation, l'adhésion, la croissance, la division, la mobilité, la contraction, la sécrétion et l'apoptose, a été mis en évidence. Le  $\text{Ca}^{2+}$  libre étant associé à une grande variété de fonctions cellulaires, plusieurs moyens d'étude de son implication ont été développés.

#### 1. Méthodes d'étude de l'implication du calcium dans les processus physiologiques

Afin de mettre en évidence le rôle du calcium dans les réponses cellulaires, plusieurs moyens permettent de modifier la concentration calcique cytosolique. Une des premières approches est d'utiliser des agents pharmacologiques qui agissent en se fixant sur les canaux calciques des membranes et bloquent (antagonistes) ou permettent (agonistes) l'influx du calcium extracellulaire. D'autres molécules agissent en facilitant le passage des ions divalents tels que le  $\text{Ca}^{2+}$  à travers les membranes, ces molécules sont appelées ionophores. Dans nos expériences nous avons utilisé un ionophore, la ionomycine couplée à une forte concentration calcique extracellulaire afin d'augmenter la concentration calcique intracellulaire et de stimuler la fixation du calcium sur une protéine liant les ions calcium, la synaptotagmine (Jahn et al., 2003; Sudhof, 2004). L'étude du rôle du calcium peut également être analysé

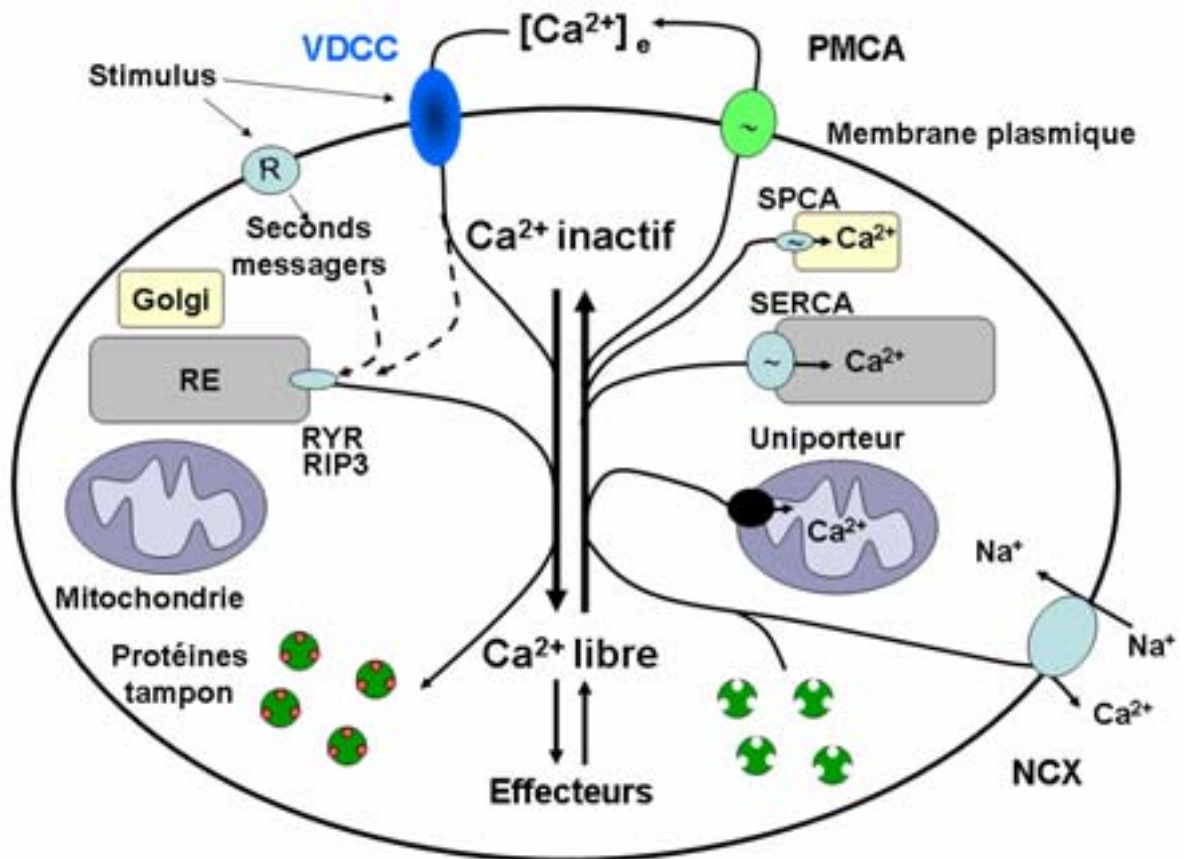
suite à une baisse de la concentration calcique. Pour cela, nous pouvons utiliser des chélateurs calciques qui séquestrent le calcium libre et ainsi diminuent la concentration intracellulaire.

Pour visualiser les variations de concentration calcique intracellulaire, plusieurs approches peuvent être utilisées. Premièrement, l'utilisation de sondes fluorescentes (par exemple le Fura-2), liant le  $\text{Ca}^{2+}$  avec une forte affinité, ont été permis de suivre les variations de calcium intracellulaire (Berridge, 1990a; Berridge, 1990b). Une autre approche est d'observer les courants calciques dans la cellule par des mesures d'électrophysiologie, ou encore d'utiliser des isotopes radioactifs ( $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ).

## **2. Le calcium : un second messenger particulier**

Le calcium est un second messenger particulier en comparaison aux autres seconds messagers qui sont les intermédiaires métaboliques tels que les nucléotides cycliques, les inositol phosphates ( $\text{IP}_3$ ,  $\text{IP}_4$ ) et le diacylglycérol (DAG), et ce pour de multiples raisons. Premièrement, le  $\text{Ca}^{2+}$  est un élément métallique divalent qui ne peut être converti en aucune autre forme. D'autre part, sa petite taille lui procure la possibilité de diffuser facilement dans le cytosol et d'accéder rapidement aux différentes protéines cellulaires. Troisièmement, par sa nature physico-chimique, il peut être impliqué dans des interactions de basse affinité sur de nombreux sites de liaison complexes au niveau des protéines. Il est donc facilement tamponné. Enfin, la présence d'une différence de concentration de part et d'autre des membranes des différents compartiments cellulaires (entre le milieu extracellulaire et le cytosol et entre le cytosol et les organelles) permet des variations importantes et rapides de la concentration calcique intracellulaire. En effet dans la cellule, le calcium est stocké dans différents compartiments intracellulaires : le réticulum endoplasmique, les lysosomes et endosomes, l'enveloppe nucléaire, les granules de sécrétion, les mitochondries et l'appareil de Golgi. Ces réserves calciques sont mobilisables sauf dans le cas de la mitochondrie et de l'appareil de Golgi où la mobilité du calcium n'est pas clairement définie (Galione and Churchill, 2002).

En conditions basales dans les cellules de mammifères, la concentration du calcium libre ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) est de l'ordre de  $0,1 \mu\text{M}$ . La stimulation cellulaire par différents agents provoque une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  libre. Cette augmentation est transitoire et sa durée est variable de l'ordre de la microseconde (exocytose) à plusieurs heures (transcription de gènes et prolifération). L'amplitude de cette augmentation est également variable en fonction du tissu et le signal calcique peut être uniforme dans une cellule ou être hautement localisé dans



**Figure i-17 : Homéostasie calcique et création d'un signal calcique cellulaire**

Le stimulus induit l'entrée du calcium par les canaux calciques (VDCC) et la formation de seconds messagers qui vont libérer le calcium du réticulum endoplasmique (RE). Une grande quantité des ions  $Ca^{2+}$  (sphères rouges) sont fixés par des protéines tampons et le reste des ions  $Ca^{2+}$  se lie à des effecteurs qui vont activer des processus cellulaire. En absence de stimulus, la libération et l'entrée de calcium ne sont plus activées. Le calcium est expulsé de la cellule par des pompes et des échangeurs qui permettent d'abaisser la concentration calcique intracellulaire. Les ions  $Ca^{2+}$  se libèrent alors des effecteurs et des protéines tampons. L'échangeur  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX) et la pompe  $Ca^{2+}$ -ATPase de la membrane plasmique (PMCA) sortent le calcium à l'extérieur de la cellule alors que la SERCA et la SPCA (*secretory-pathway  $Ca^{2+}$ -ATPase*) pompent le calcium, respectivement dans la lumière du RE et de l'appareil de Golgi. Les mitochondries détectent les fortes quantités de calcium cytoplasmique et peuvent séquestrer rapidement le calcium à travers un uniporteur.

RIP<sub>3</sub> : ses récepteurs à l'IP<sub>3</sub>, RYR : récepteur à la ryanodine.

une région de la cellule. Dans la plupart des systèmes cellulaires, le niveau de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire oscille. Récemment, des travaux ont montré les oscillations du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire dans des lignées des cellules  $\beta$ -pancréatiques (Lajus et al., 2006). La fréquence des oscillations dépend du type cellulaire, et de nombreux régulateurs cellulaires comme les hormones, les neurotransmetteurs, les facteurs de croissance et les cytokines. Suite à la stimulation de la cellule par ces régulateurs, la fréquence d'oscillation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  augmente et elle semble représenter un code périodique qui permet de distinguer le type et la concentration des effecteurs extracellulaires.

## **B. La signalisation calcique intracellulaire**

### **1. La création du signal calcique**

#### 1.1. L'homéostasie calcique cellulaire au repos

Comme nous venons de le voir, il est nécessaire que la concentration calcique cytosolique soit faible et constante pour qu'une augmentation de la concentration calcique induise une signalisation cellulaire. Les cellules sont capables de maintenir une concentration de calcium libre ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) de 0,1  $\mu\text{M}$  au repos, dans un environnement où la concentration calcique extracellulaire est de l'ordre du mM chez les mammifères. Le maintien de cette concentration cytosolique est possible grâce à de nombreuses pompes calciques et échangeurs au niveau des membranes et grâce à des protéines tampon qui fixent le calcium (figure i-17).

La membrane plasmique contient des pompes calciques ATP-dépendantes (PMCA, *plasma-membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase*) et des échangeurs  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX,  *$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger*) (Bataille, 2002; Dawson, 1990). Ces protéines transmembranaires expulsent le calcium à l'extérieur de la cellule et permettent à la membrane plasmique de constituer une barrière aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaires.

Au niveau des compartiments sous-cellulaires, d'autres protéines membranaires permettent le transport des ions  $\text{Ca}^{2+}$  du cytosol vers la lumière des organelles. Sur la membrane de l'appareil de Golgi se trouve les pompes calciques SPCAs (*secretory-pathway  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases*) qui captent le calcium cytosolique. La mitochondrie joue également un rôle important dans le maintien de l'homéostasie calcique grâce à la présence d'un canal calcique appelé calcium uniporteur (Kirichok et al., 2004). Dès que la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  atteint le seuil critique de 330 nM (Berridge, 2004), la mitochondrie permet le passage du calcium cytosolique vers la

lumière mitochondriale grâce à l'ouverture du canal uniporteur. Cette valeur étant très basse, il existe un flux permanent de  $\text{Ca}^{2+}$  suivant le gradient électrochimique vers la matrice mitochondriale.

Au niveau du réticulum endoplasmique (RE), une pompe calcique *sarco(endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase* (SERCA) est localisée sur la membrane et permet de séquestrer le  $\text{Ca}^{2+}$  dans la lumière du RE. Chez les mammifères, trois différents gènes codent chacun pour deux isoformes de SERCA, dont l'expression est spécifique du tissu. L'isoforme SERCA2b est la forme localisée dans le RE de la majorité des cellules (Vangheluwe et al., 2005). L'extrémité Carboxy-terminale de la SERCA2b se situe dans la lumière du RE et la partie N-terminale est cytosolique. De ce fait, la régulation de l'activité de la pompe provient de régulateurs du RE et du cytosol. Par exemple, dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques, l'activité de la SERCA2b est modulée par les IRS (*insulin receptor substrate*) qui se lient au niveau de la partie cytoplasmique de la pompe. En effet, lors de la libération d'insuline par les cellules  $\beta$ -pancréatiques, l'insuline effectue un rétro-contrôle sur sa libération en se fixant sur ses récepteurs au niveau des cellules  $\beta$ -pancréatiques. Ceci induit la transduction d'un signal par l'intermédiaire d'un substrat du récepteur à l'insuline, IRS-1 qui se lie à la pompe SERCA et inhibe son activité. Il s'en suit une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  due à une sortie du calcium du RE (Xu et al., 2000). Cette élévation de la concentration cytosolique participe à la libération de l'insuline.

En plus des pompes et les échangeurs calciques qui permettent de maintenir la concentration calcique cytosolique basse, la présence de nombreuses protéines tampon permet de capter le calcium libre sous forme de calcium lié inactif. Parmi ces protéines tampon, certaines sont cytosoliques (calbindine D-28, calrétinine, parvalbumine) et d'autres sont localisées dans le RE comme la calnexine, la calsequestrine ou la calréticuline. D'ailleurs dans la lumière du RE, la calréticuline régule l'activité de la SERCA par son extrémité C-terminal. Dès que la concentration  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  atteint un niveau trop bas, la calréticuline ne se lie plus au calcium et se retrouve sous une forme libre qui se fixe au domaine C-terminal de la pompe et l'active (Michalak et al., 1999). La SERCA assure donc le retour de la concentration calcique du réticulum endoplasmique à l'état basal en pompant le calcium du cytoplasme et ainsi participe au maintien de la concentration calcique du RE qui est de l'ordre de 400  $\mu\text{M}$  (Miyawaki et al., 1997)

## 1.2. L'augmentation du calcium cytosolique

L'augmentation du calcium cytosolique est induite par une entrée du calcium extracellulaire et une libération du calcium des réserves intracellulaires mobilisables (figure i-17).

De nombreux canaux calciques sont localisés sur la membrane plasmique tels que les canaux calciques voltages dépendants (VDCC), les récepteurs ionotropiques (par exemple le récepteur de l'acétylcholine), les canaux liés aux nucléotides cycliques (CNG, *cyclic nucleotide gated channels*), les TRP (*Transient receptor potential*) et les canaux mécanosensibles (localisés dans le cœur). L'activation de ces canaux pendant la transmission d'un signal cellulaire, permet l'entrée du calcium extracellulaire dans la cellule. Lors de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$ -pancréatiques, 60 à 80% des ions  $\text{Ca}^{2+}$  qui déclenchent l'exocytose proviennent d'une entrée des ions calciques par les canaux calciques voltages dépendants (Ohta et al., 1993; Wollheim et al., 1975).

La libération du calcium à partir des réserves intracellulaires participe aussi à l'augmentation du calcium intracellulaire. Plusieurs seconds messagers interviennent dans ces processus de libération : l'inositol-1,4,5-trisphosphate ( $\text{IP}_3$ ), l'adénosine diphosphate cyclique ribose (cADPR) et l'acide nicotinique adénine dinucléotide phosphate (NAADP).

Plusieurs stimuli cellulaires activent la PLC qui va générer l'inositol 1,4,5-trisphosphate ( $\text{IP}_3$ ). L' $\text{IP}_3$  se lie alors sur ses récepteurs ( $\text{RIP}_3$ ) présents sur la membrane du RE, et induit un changement conformationnel du récepteur qui permet l'ouverture du canal et la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol (Berridge et al., 2000). Plusieurs isoformes de PLC existent et sont activées spécifiquement par des protéines G couplées aux récepteurs ( $\text{PLC}\beta$ ), par des récepteurs tyrosine ( $\text{PLC}\gamma$ ), par l'augmentation du calcium cytosolique ( $\text{PLC}\delta$ ) ou par des protéines Ras ( $\text{PLC}\epsilon$ ). Chaque type cellulaire exprime spécifiquement ces isoformes, ce qui participe à la variabilité de la réponse calcique. Au niveau du RE, un autre type de récepteurs est responsable de la libération du calcium à partir de cette réserve, les récepteurs à la ryanodine (RYRs). Dans les cellules de mammifère, trois types de récepteurs RYR sont exprimés, le type I, II et III. Dans les îlots et les lignées insulino-sécrétoires, l'isoforme II est la forme la plus abondante et est retrouvée sur la membrane du RE et de l'appareil de Golgi. A l'inverse, l'isoforme I est localisée essentiellement sur la membrane des vésicules sécrétoires (LDCV) (Mitchell et al., 2003). L'agoniste endogène de ces récepteurs n'est pas connu. Ces récepteurs ainsi que les  $\text{RIP}_3$  sont sensibles au calcium et le processus de CICR

( $Ca^{2+}$ -INDUCED  $Ca^{2+}$  RELEASE) contribue à la rapide augmentation du calcium intracellulaire. Dans la cellule  $\beta$ -pancréatique, la libération du calcium à partir de la réserve du RE est cruciale lors de la sécrétion d'insuline. Cependant, l'activation de la libération du calcium du RE par le CICR est controversé (Lemmens et al., 2001; Maechler et al., 1999). Le métabolisme du glucose pourrait produire d'autres intermédiaires nécessaires à l'activation des récepteurs  $RIP_3$  et RYR, tels que l'AMPc (Islam et al., 1998).

Les seconds messagers NAADP et cADPR sont des messagers métaboliques qui mobilisent le calcium intracellulaire par des mécanismes différents de ceux décrits au-dessus. Le NAADP déclenche la libération du calcium à partir de stocks intracellulaires granulaires différents du RE. Récemment, dans une lignée de cellules insulino-sécrétoires (MIN-6), l'activation des récepteurs RYR de type I localisés sur les LDCV, par le NAADP, a été mise en évidence. Ce second messenger se fixerait sur des récepteurs non identifiés et activerait l'ouverture des RYR type I permettant ainsi la sortie du calcium à partir des LDCV (Mitchell et al., 2003).

En ce qui concerne le cADPR, ce messenger métabolique agit plus comme un modulateur qu'un second messenger. Son effet n'est pas immédiat et il agit en augmentant la sensibilité des récepteurs RYRs par un mécanisme peu connu (Lee, 1997).

L'entrée du calcium extracellulaire et la libération du calcium intracellulaire stocké dans les réserves intracellulaires sont responsables de l'augmentation calcique cytosolique. Suite à cette élévation de la concentration calcique dans le cytosol, plusieurs protéines liant les ions  $Ca^{2+}$  vont être activées et vont ainsi médier le signal cellulaire.

## **2. La médiation du signal calcique : les senseurs calciques**

Dans les cellules, un grand nombre de protéines sont capables de lier le  $Ca^{2+}$  et de transmettre le signal calcique. Ces protéines sont appelées senseurs calciques et il en existe trois grandes familles : les protéines contenant un domaine *EF-hand*, les annexines et les protéines possédant un domaine C2.



### 2.1. Les protéines à domaines *EF-hand*

La famille la plus décrite des protéines intracellulaires liant le  $\text{Ca}^{2+}$ , est caractérisée par une structure protéique connue sous le nom de domaine *EF-hand*. Ce motif est une structure de type hélice-boucle-hélice capable de lier un ion  $\text{Ca}^{2+}$  (Yap et al., 1999). Les acides aminés responsables de la liaison calcique sont localisés au niveau de la boucle. Dans cette famille de senseurs calciques, on retrouve la calmoduline, la troponine, l'albumine ou encore les calpaïnes qui sont des protéases.

La calmoduline est très connue pour son rôle de senseur calcique dans de nombreux phénomènes de fusion membranaire tels que la fusion vacuolaire de la levure, les étapes du transport trans-golgien (Mayer, 2001; Peters and Mayer, 1998), et l'exocytose calcium-dépendante dans les cellules PC12 (Quetglas et al., 2002). En effet, cette protéine présente une forte affinité pour le calcium du fait de la présence de quatre domaines de liaison au calcium de type *EF-Hand*. La calmoduline peut également lier les phospholipides acides, ainsi que la protéine VAMP2 qui participe à la machinerie de fusion des membranes (De Haro et al., 2003). De plus, une fois liée au  $\text{Ca}^{2+}$ , elle présente une grande affinité pour un certain nombre d'enzymes telles que des protéines kinases, des phosphatases, des hydrolases dont l'activité sera modulée et qui à leur tour vont permettre la transduction d'un signal.

### 2.2. Les annexines

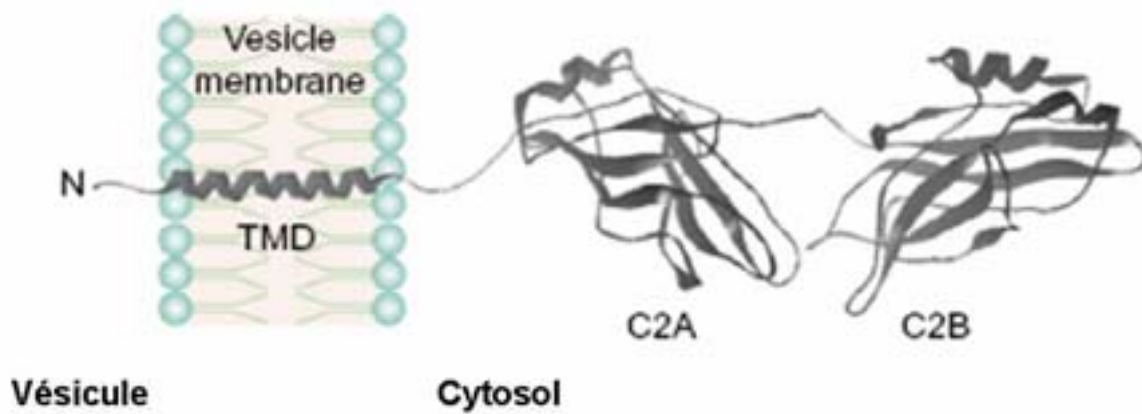
La seconde famille est constituée de protéines fixant les phospholipides de façon dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces protéines sont appelées les annexines (Crumpton and Dedman, 1990). Il existe une dizaine d'annexines chez les mammifères. La majorité des annexines contiennent un coeur constitué de quatre domaines répétés, chacun contenant environ 70 acides aminés. Ces domaines permettent de lier les ions calcium. Lors d'une stimulation, la concentration calcique intracellulaire à proximité des membranes atteint localement des valeurs de l'ordre du millimolaire (Llinas et al., 1992) et les annexines s'associent alors à des protéines cibles en se fixant aux phospholipides membranaires. Les annexines vont ensuite s'associer entre elles et former des complexes multimériques autour des protéines cibles et ainsi permettre la transmission du signal cellulaire. Il a été proposé que les annexines régulent différents types de trafics membranaires tels que l'adhésion cellule-cellule, l'endocytose et l'exocytose (Lafont et al., 1998).

### 2.3. Les protéines à domaines C2

La protéine représentant cette famille est la protéine kinase C (PKC) qui a été la première décrite au niveau de son domaine C2. Les domaines C2 sont constitués de 8 feuillets  $\beta$  reliés entre eux par des boucles au niveau desquelles les ions calcium sont liés. La liaison du calcium induit un changement conformationnel qui permet la fixation de la protéine à la phosphatidylsérine (PS) au niveau des membranes. Ainsi, une fois activée par le  $\text{Ca}^{2+}$ , la PKC transloque à la membrane plasmique, c'est-à-dire qu'elle passe d'une forme cytoplasmique à une forme liée aux membranes. La PKC attachée à la membrane peut alors être stimulée par le DAG et phosphoryler des substrats pour transmettre la voie de signalisation. L'activation de la PKC peut d'ailleurs aboutir à une modulation de la transmission et de la plasticité synaptique au niveau des neurones (Malenka and Nicoll, 1999), ou à une augmentation de la sécrétion dans les cellules chromaffines PC12 (Chen et al., 1999; Chen et al., 2001). Au niveau de la sécrétion dans les cellules endocrines (cellules chromaffines et insulino-sécrétoires), la PKC agirait au niveau des étapes dépendantes de l'ATP lors du rapprochement des vésicules à la membrane plasmique car son activation provoque le recrutement des vésicules RRP et HCSP à partir du pool de réserve (Smith, 1999; Yang and Gillis, 2004; Yang et al., 2002). Ceci induit une augmentation de la taille des pools vésiculaires et donc favorise la sécrétion des vésicules suite à un stimulus calcique. Dans cette famille de protéine à domaines C2, on trouve plusieurs protéines telle que la phospholipase C ou les synaptotagmines qui contiennent deux domaines C2. Ces dernières protéines, les synaptotagmines, sont impliquées dans de nombreuses étapes du trafic vésiculaire et essentiellement dans les mécanismes d'exocytose régulée par le calcium tels que la sécrétion d'insuline.

#### IV. LES SYNAPTOTAGMINES

Les synaptotagmines (Syt) constituent une grande famille de protéines présentes chez les eucaryotes et actuellement 16 isoformes ont été identifiées chez la souris. Certains membres de cette famille sont impliqués en tant que senseur calcique dans divers types de trafic vésiculaire tel que l'exocytose neuronale, la sécrétion d'insuline, la réparation de la membrane plasmique, la fusion des lysosomes et la croissance dendritique (Marqueze et al., 2000). La fonction de senseur calcique de ces protéines est due à la présence de deux domaines C2 homologues au domaine C2 de la PKC. Ces deux domaines, appelés C2A et C2B, lient le calcium avec de hautes affinités et en présence de phospholipides, ce qui induit un changement du potentiel électrostatique de surface. Les domaines C2 peuvent alors se lier aux phospholipides membranaires et aux protéines du complexe de fusion, les protéines SNARE. Ces interactions participent au déclenchement de la fusion des membranes. Toutes les isoformes ne présentent pas les mêmes affinités pour le calcium, les phospholipides membranaires et les protéines SNARE, et leur expression et localisation cellulaire est spécifique de l'isoforme. Ceci suggère des rôles divers des différentes isoformes. Les caractéristiques biochimiques et fonctionnelles des différentes Syt sont comparées à celles de Syt 1. En effet, Syt 1 est la première isoforme découverte et donc la mieux caractérisée, ce qui fait d'elle le modèle d'étude des synaptotagmines. Syt 1 est fortement exprimée dans le cerveau où elle est localisée sur les vésicules synaptiques dans les neurones. Cette protéine tient le rôle de senseur calcique de l'exocytose des neurotransmetteurs et est aussi impliquée dans l'endocytose pour recycler les vésicules. Dans cette partie sur les synaptotagmines, toutes les données sur les interactions biochimiques avec les phospholipides membranaires et les protéines SNARE, et sur les études fonctionnelles, sont issues d'études sur Syt 1.



**Figure i-18 : Structure générale de la synaptotagmine 1**

Syt 1 est une protéine vésiculaire ancrée à la membrane par son domaine transmembranaire unique (TMD). Son extrémité N-terminale est vésiculaire et son domaine cytosolique contient deux domaines C2 conservés appelés domaines C2A et C2B.

Adapté de (Bai and Chapman, 2004)

## **A. La grande famille des Synaptotagmines**

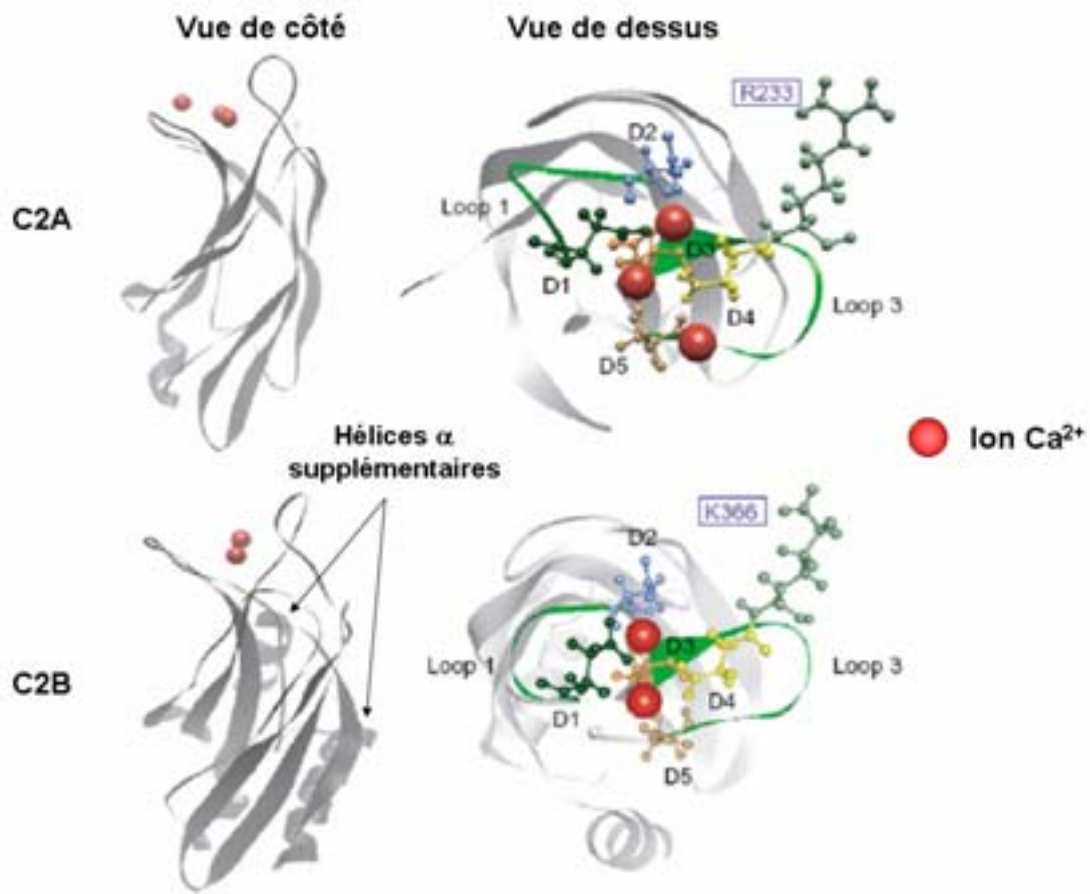
La famille des Syt constitue une grande famille protéique dont certaines de ces 16 isoformes actuellement connues, présentent des caractéristiques spécifiques. La majorité des Syt actuellement découvertes possèdent une structure commune constituée d'un domaine transmembranaire et d'un long domaine cytoplasmique susceptible de subir plusieurs modifications pos-traductionnelles. Au niveau de cette région cytoplasmique on retrouve les deux domaines C2 dans toutes les synaptotagmines. Etant donné que Syt 1 est l'isoforme la plus étudiée, cette partie décrit les domaines à partir de la structure de Syt 1.

### **1. Structure générale de Syt 1**

La Synaptotagmine 1 (Syt 1) ou p65 (protéine de 65 kDa) a été décrite pour la première fois par Matthew et coll. en 1981, en utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre un homogénat de membrane synaptique. Syt 1 est un constituant majeur des vésicules synaptiques (Matthew et al., 1981) et des vésicules larges à cœur dense (Walch-Solimena et al., 1993). Cette protéine est extrêmement conservée chez les vertébrés et elle a été la première des Syt à être clonée (Perin et al., 1990). Syt 1 est une protéine transmembranaire localisée sur les vésicules synaptiques. Elle possède un domaine amino-terminal intra-vésiculaire constitué d'une soixantaine d'acides aminés, suivi d'un domaine transmembranaire unique estimé à 21 acides aminés. La partie cytosolique de la protéine est composée d'un domaine variable proximal à la membrane plasmique d'une longueur de 160 acides aminés. Ce domaine est très variable dans sa séquence et sa longueur entre les différentes isoformes de Syt. Suite à cette région variable, deux domaines C2 carboxy-terminale très conservés sont localisés, chacun faisant environ une centaine d'acides aminés (figure i-18).

#### **1.1. Les domaines C2**

Les domaines C2 de Syt 1 portent les fonctions majeures de cette protéine. Comme nous le détaillerons par la suite, la fixation des ions  $\text{Ca}^{2+}$  via des interactions ioniques avec les résidus aspartates des boucles des domaines C2, induisent les interactions de Syt 1 avec les phospholipides anioniques et les protéines t-SNARE.



**Figure i-19 : Structure tridimensionnelle des domaines C2 et liaison des ions  $\text{Ca}^{2+}$**

Les structures cristallographiques des domaines C2 montrent la présence de 8 feuilletts  $\beta$  reliés par des boucles. Au sommet de chaque domaine, les boucles 1 et 3 (loop 1 et loop 3) contiennent cinq résidus aspartates (D1 à D5) responsables de la fixation de 3 ions  $\text{Ca}^{2+}$  pour le domaine C2A et de 2 ions  $\text{Ca}^{2+}$  pour le domaine C2B. Deux hélices  $\alpha$  sont retrouvées uniquement dans le domaine C2B. Deux résidus hydrophobes R233 et K366 sont présents à proximité des boucles et tiennent un rôle important dans la fonction des domaines C2.

Adapté de (Bai and Chapman, 2004)

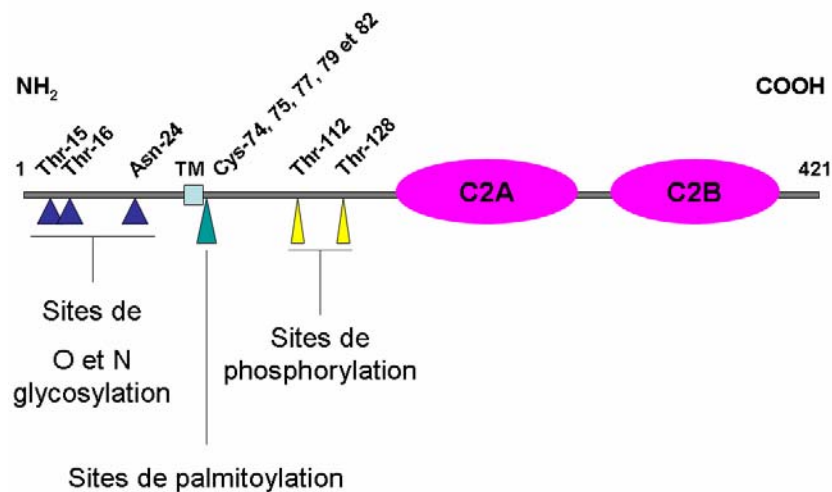
Les domaines C2 constituent la majorité de la partie cytoplasmique de Syt 1 et ils ont été initialement identifiés dans la protéine PKC (Jimenez et al., 2003). Ces domaines sont constitués de 80 à 160 acides aminés (Rizo and Sudhof, 1998) et chacun prend une structure tridimensionnelle caractérisée par 8 feuillets  $\beta$  reliés les uns aux autres par des boucles (figure i-19) (Sutton et al., 1995). Les feuillets  $\beta$  s'organisent de façon antiparallèle en «clé grecque» le long d'un axe de 50 Å (Ubach et al., 1998), quatre feuillets faisant face aux quatre autres. Au « sommet » des domaines C2, deux des trois boucles (1<sup>ère</sup> et 3<sup>ème</sup> boucles) reliant les feuillets  $\beta$ , portent des résidus aspartates qui, grâce à leurs charges négatives, sont capables de lier des ions calcium (Shao et al., 1998; Sutton et al., 1995). Au niveau du domaine C2A, les résidus coordonnant les ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont les aspartates Asp172, Asp178, Asp230, Asp232 et Asp238 (respectivement numérotés D1, D2, D3, D4 et D5) ainsi que la sérine 235 (numéro des acides aminés de Syt 1 chez le rat). Pour le domaine C2B, les résidus impliqués dans la fixation des ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont les aspartates Asp303, Asp309, Asp363, Asp365 et Asp371 (respectivement numérotés D1, D2, D3, D4 et D5). La détermination de l'implication de ces résidus dans la coordination du calcium a été réalisée par des expériences de mutagenèse dirigée (Bai et al., 2002; Earles et al., 2001; Mackler et al., 2002; Nishiki and Augustine, 2004a) et des études de cristallographie ont montré la fixation de trois ions  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau des boucles du domaine C2A (Ubach et al., 1998) et de deux ions  $\text{Ca}^{2+}$  sur le domaine C2B (Fernandez et al., 2001).

La fixation du calcium au niveau des boucles induit un changement du potentiel électrostatique de surface qui devient positif et permet donc la fixation des domaines sur les phospholipides membranaires chargés négativement (phospholipides anioniques). Les aspartates ne sont pas les seuls résidus responsables de la liaison aux membranes. Deux arginines (Arg 199 et 233) au niveau du domaine C2A semblent impliquées dans la fixation aux membranes riches en phospholipides anioniques (par exemple la phosphatidylsérine) (figure i-20), tandis qu'au niveau du domaine C2B, une région polybasique (acides aminés 324 à 332) riche en lysine dans le quatrième feuillet  $\beta$  (Jimenez et al., 2003) et un résidu lysine hydrophobe (K366) participent à la liaison aux membranes. De plus, deux hélices  $\alpha$  sont retrouvées dans le domaine C2B et non dans le C2A, ce qui pourrait être à l'origine des fonctions  $\text{Ca}^{2+}$ -indépendantes du domaine C2B que nous décrirons par la suite (chapitre B1).

	Résidus	C2A	C2B
Boucles	D1	172	303
	D2	178	309
	D3	230	363
	D4	232	365
	D5	238	371
Autres résidus	Sérine	235	-
	Résidus hydrophobes	Arg-233 Arg-199	K-366
			Région polybasique 324-332
			2 hélices $\alpha$

**Figure i-20: Tableau récapitulatif des acides aminés intervenants dans la liaison aux membranes.**

Au niveau des boucles de chaque domaine C2, cinq résidus aspartates (D1 à D5) sont responsables de la coordination des ions calcium. Dans le domaine C2A, la sérine 235, localisée aussi dans les boucles, intervient dans la liaison du calcium. D'autres résidus, également localisés dans les boucles des domaines C2, participent à la liaison aux phospholipides membranaires par des interactions hydrophobes : les arginines 233 et 199 dans le domaine C2A et la lysine 366 dans le domaine C2B. Le domaine C2B présente deux caractéristiques propres : une région polybasique riche en lysine dans le 4<sup>ème</sup> feuillet  $\beta$  et deux hélices  $\alpha$ . La numérotation des acides aminés correspond à la séquence Syt 1 chez le rat.



**Figure i-21: Les modifications post-traductionnelles de Syt 1**

Syt 1 possède 3 sites de glycosylation (O et N) dans la partie N-terminale. A proximité du domaine transmembranaire (TMD), cinq cystéines sont localisées et constituent un site de palmitoylation. Deux sites de phosphorylation (Thr-112 et Thr-128) sont situés entre le TMD et le domaine C2A.



## 1.2.Régulation de Syt 1 par des modifications post-traductionnelles

Syt 1 est une protéine transmembranaire localisée sur les vésicules de sécrétion dans différents types cellulaires et majoritairement sur les vésicules synaptiques dans les neurones. Sa localisation et sa fonction sont régulées par plusieurs modifications post-traductionnelles (figure i-21).

### 1.2.1. La glycosylation

La région intra-vésiculaire de Syt 1 porte des sites de O et N-glycosylation. Les O-glycosylations sont réalisées au niveau de deux résidus thréonine, Thr-15 et Thr-16 (Fukuda, 2002; Perin et al., 1991). Ce type de glycosylation semble être nécessaire à l'internalisation de Syt 1 et Syt 2 à partir de la membrane plasmique pour que ces protéines soient correctement localisées dans les cellules sécrétoires non neuronales (Atiya-Nasagi et al., 2005). Le résidu asparagine en position 24 est un site de N-glycosylation (Perin et al., 1991) et des expériences de mutagenèse ont montré que cette N-glycosylation de Syt 1 était importante pour un adressage correct aux vésicules synaptiques (Han et al., 2004a).

### 1.2.2. La palmitoylation

A la jonction entre le domaine transmembranaire et le domaine cytoplasmique (domaine de liaison), se trouvent 5 cystéines, correspondant à des sites de palmitoylation (Chapman et al., 1996; Heindel et al., 2003). Ces palmitoylations auraient un rôle dans l'oligomérisation calcium-indépendante entre les différentes isoformes de Syt (Fukuda et al., 2001; Fukuda and Mikoshiba, 2000a). En outre, ce type d'oligomérisation de Syt 1 semble être importante pour la régulation de l'assemblage des puits recouvert de clathrine lors de l'endocytose (von Poser et al., 2000a).

Récemment, des études ont montré l'importance de la palmitoylation de Syt 1 dans le trafic de cette protéine à la sortie de l'appareil de Golgi vers des structures vésiculaires. Ainsi, la palmitoylation de Syt 1 permet l'adressage correct de Syt 1 sur les vésicules synaptiques et le fonctionnement de Syt 1 en tant que senseur calcique dans l'exocytose des neurotransmetteurs. La palmitoylation régule donc l'activité synaptique (Kang et al., 2004).

### 1.2.3. La phosphorylation

Plusieurs sites de phosphorylation ont été identifiés dans la structure de Syt 1, cependant toutes ces phosphorylations ne semblent pas avoir un rôle fonctionnel. Par exemple, le domaine de liaison de Syt 1 contient une thréonine (Thr-128) qui correspond à un site de phosphorylation par la caséine kinase II (Davletov et al., 1993) mais l'aspect fonctionnel de cette phosphorylation n'a jamais été mis en évidence. De même, la mutation de la thréonine Thr-112 qui est un site de phosphorylation par la kinase PKC et la calcium/calmoduline-dépendante kinase (CaMKII) n'a aucun effet sur le rôle de Syt 1 au niveau de l'exocytose du pool RRP de vésicules (Nagy et al., 2006).

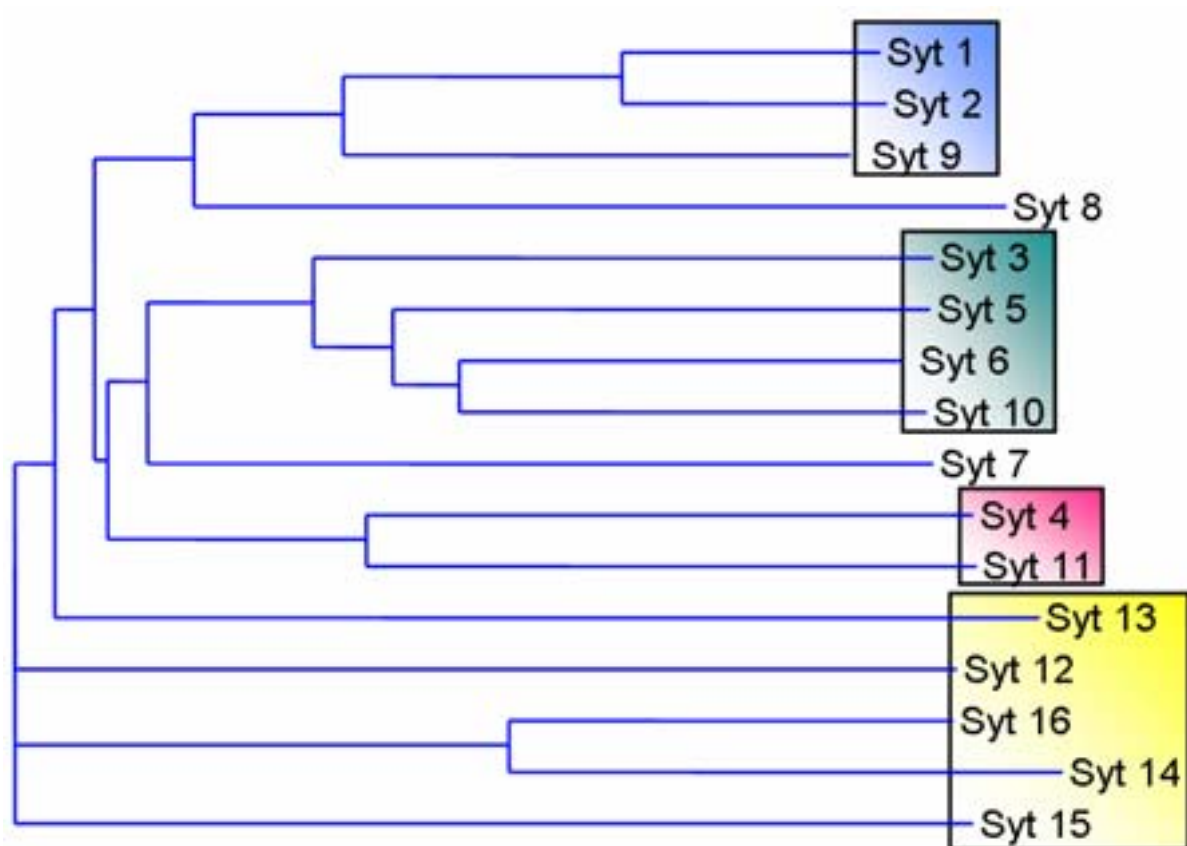
D'autres sites de phosphorylations fonctionnelles ont été découverts dans des isoformes autres que Syt 1 et essentiellement dans les domaines C2. Les WNKs (*with no lysine [K]*) sont des sérine-thréonine kinases (Xu et al., 2005) dont l'isoforme WNK1 a été identifiée comme phosphorylant spécifiquement la protéine Syt 2 au niveau de la Thr-202 du domaine C2A. Cette phosphorylation module les interactions  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendantes de Syt 2 avec les phospholipides et ainsi régule la fonction de senseur calcique dans la lignée cellulaire INS-1 (Lee et al., 2004). Dans l'isoforme Syt 9, la phosphorylation par la PKC d'un site au niveau des domaines C2 régule la localisation de cette protéine dans une lignée clonale dérivée des mastocytes, les cellules RBL (*Rat Basophilic Leukemia*) (Haberman et al., 2005). De même, la phosphorylation de Syt 6 par la PKC régule son activité (Roggero et al., 2005).

## 2. Comparaison génétique des synaptotagmines

Les synaptotagmines forment une famille de protéines, constituée de plusieurs isoformes chez les eucaryotes supérieurs (Craxton, 2004b). La découverte récente chez la levure, d'une protéine portant deux domaines C2, la tricalbin (Creutz et al., 2004; Schulz and Creutz, 2004), permet d'envisager un rôle général de ces protéines dans le transport cellulaire (Craxton, 2001). Seize isoformes (Syt 1 à Syt 16) ont été décrites chez l'homme et la souris, 15 chez le rat (Fukuda, 2003a; Fukuda, 2003b). L'homologie de séquence entre ces isoformes réside essentiellement dans les domaines C2.

L'analyse *in silico* de la position des exons et des introns a permis de séparer les différentes isoformes en sous familles. Les gènes codant pour les isoformes Syt 1, Syt 2, Syt 9 et Syt 8 sont constitués de 8 exons, séparés par des introns de taille variable (Fukuda and Mikoshiba, 2000b). Le gène de Syt 7, par contre, possède une structure bien plus complexe





**Figure i-22 : Arbre de comparaison de séquences de la famille des synaptotagmines**

L'arbre est réalisé après alignement des séquences protéiques des isoformes de souris des synaptotagmines par le programme d'alignement du logiciel Vector NTI. Quatre sous-familles se dessinent et sont représentées dans des cadres de couleur. Syt 7 et Syt 8 ne sont pas incluses dans ces quatre sous-familles.

avec 14 exons, alors que les isoformes Syt 4 et Syt 11 ne contiennent que 4 exons (Sudhof, 2002).

Certaines caractéristiques sont communes à l'ensemble des isoformes, par exemple quelle que soit l'isoforme, le domaine transmembranaire est codé par le deuxième exon. De plus, l'exon codant pour la partie amino-terminale du domaine C2B est commun à toutes les isoformes et constitue la signature de la famille (Craxton and Goedert, 1999).

La présence de nombreux variants d'épissage pour certaines isoformes montre la complexité de régulation de l'expression de ces protéines (Craxton and Goedert, 1999). Des variants d'épissage ont été décrits pour les protéines Syt 1, Syt 6 et Syt 7 (Fukuda et al., 2002c; Sugita et al., 2001). L'épissage alternatif se fait au niveau du domaine transmembranaire (pour Syt 6 et Syt 7) et au niveau du domaine de liaison de la protéine (Syt 1 et Syt 7). Des analyses *in silico* sur les structures génomiques (ADN), associées à l'analyse des transcrits, prédisent des variants d'épissage pour les isoformes, Syt 4 (Craxton and Goedert, 1999) et Syt 15 (Fukuda, 2003b). La totalité des gènes codant pour les synaptotagmines n'a sans doute pas été identifiée dans tous les organismes et l'ensemble des variants d'épissage possibles pour chaque isoforme reste à être décrit.

### **3. Classification et caractéristiques des différentes isoformes**

Outre cette classification par analyse *in silico* de la position et du nombre des jonctions introns/exons (Sudhof, 2002), les isoformes peuvent être classées en différentes sous familles, qui varient selon le critère choisi : l'homologie des séquences protéiques des domaines C2 (Rickman et al., 2004b), la cinétique de détachement des membranes suite à la séquestration du calcium (Hui et al., 2005) ou la similitude des séquences peptidiques de l'ensemble de la protéine.

Suivant ce dernier critère et les caractéristiques biochimiques, les 16 isoformes ont été regroupées en quatre grandes classes (figure i-22). Deux isoformes, Syt 7 et Syt 8 sont considérées de façon individuelle car elles possèdent des caractéristiques très spécifiques.

#### **3.1. Syt 1, 2, 9**

Le premier sous groupe est composé des isoformes Syt 1, Syt 2 et Syt 9. Syt 1 est une protéine capable de lier les phospholipides et les protéines SNARE de manière dépendante du calcium par ces domaines C2, avec une forte affinité. Les caractéristiques biochimiques de

isoforme Syt	Expression/ Localisation			Interaction		
	Cellule $\beta$ primaire	Lignées insulino-sécrétoires	îlots pancréatiques	phospholipides	SNARE	
Syt 1	Ø	LDCV/SLMV	Ø	+	+	
Syt 2	Ø	LDCV/SLMV	Ø	+	+	
Syt 9	LDCV	LDCV	+	+	+	
Syt 3	Ø	membrane plasmique (MP)	MP cellules $\delta$	+	+	
Syt 5	Ø	LDCV	LDCV dans cellules $\alpha$	+	+	
Syt 6	+	?	+	+	+	
Syt 10	?	?	?	+	+	
Syt 4	TGN	TGN	TGN cellules $\alpha$ et $\beta$	-	+	
Syt 11	?	?	?	-	?	
Syt 12	?	?	?	-	-	
Syt 13	?	?	?	-	-	
Syt 14	?	?	?	?	?	
Syt 15	?	?	?	?	?	
Syt 16	?	?	?	?	?	
Syt 7	+	LDCV	+	+	+	
Syt 8	+	+	+	-	+	

**Figure i-23 : Expression et localisation des isoformes des Syt dans le pancréas endocrine**

Tableau récapitulatif des données connues sur l'expression et la localisation des différentes isoformes des synaptotagmines dans les cellules  $\beta$  primaires et les lignées dérivées et sur les îlots pancréatiques avant le début de l'étude. Les caractéristiques biochimiques (liaisons aux phospholipides et aux protéines SNARE) sont aussi indiquées dans les deux dernières colonnes.

Ø: pas d'expression, ? : pas déterminé, + : expression/interaction positive, - : pas d'interaction

liaison aux phospholipides et aux protéines SNARE de Syt 1 et Syt 9 seront détaillées précisément dans la Partie IV, Chapitre B et F. Syt 2 présente une forte homologie avec Syt 1 et ses affinités pour les phospholipides et les protéines SNARE sont comparables à celles de Syt 1 (figure i-23) (Fukuda, 2002; Rickman et al., 2004b; Sudhof, 2002). De même, le domaine C2A de Syt 9 possède les mêmes caractéristiques biochimiques de liaison aux phospholipides que le domaine C2A de Syt 1. Cependant, le domaine C2B de Syt 9 présente un comportement très distinct de celui de Syt 1 puisqu'il ne se lie pas aux phospholipides des membranes (Shin et al., 2004).

Syt 1 et Syt 2 sont majoritairement exprimées dans le cerveau (Li et al., 1995). Leurs distributions sont généralement complémentaires bien que ces deux isoformes puissent être exprimées dans les mêmes neurones au niveau du cerveau (Geppert et al., 1991; Marqueze et al., 1995; Ullrich and Sudhof, 1995). Dans les neurones, Syt 1 et Syt 2 sont localisées sur les vésicules synaptiques (SV) et sont les senseurs calciques de la neurosécrétion (Fernandez-Chacon et al., 2001; Koh and Bellen, 2003; Pang et al., 2006). Dans les cellules hématopoïétiques, l'isoforme Syt 2 est le senseur calcique de l'exocytose des vésicules contenant des substances bactéricides dans les neutrophiles (Lindmark et al., 2002). Ces Syt régulent donc la réponse immunitaire. Dans un autre type de cellules hématopoïétiques, les mastocytes, Syt 1 et Syt 2 permettent aussi la dégranulation de ces cellules (Baram et al., 1998). Récemment, dans une lignée clonale dérivée des mastocytes, les cellules RBL (*Rat Basophilic Leukemia*), l'expression endogène de Syt 2 a été montrée ainsi que l'effet inhibiteur qu'elle exerce sur l'exocytose des lysosomes (Zhang et al., 2005a; Zhang et al., 2005b). Il semble donc que Syt 2 pourrait stimuler l'exocytose des granules dans les mastocytes et parallèlement inhiber l'exocytose des lysosomes dans ces mêmes cellules. Néanmoins, les différences de fonction des Syt observées entre les cellules primaires et les lignées peuvent provenir d'une dérive des cellules clonales. Par exemple, dans les cellules  $\beta$  primaires du pancréas, les Syt 1 et 2 ne sont pas exprimées (figure i-23). Pourtant dans les lignées insulino-sécrétoires dérivées de ces cellules, Syt 1 et Syt 2 sont exprimées et localisées sur les granules contenant l'insuline et les SLMV, où elles jouent le rôle de senseur calcique de l'exocytose (Jacobsson et al., 1994; Lang et al., 1997a). Dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques primaires, seule Syt 9 est localisée sur les LDCV et donc pourrait être le senseur calcique de l'exocytose de l'insuline (Iezzi et al., 2005a; Iezzi et al., 2004). Cette isoforme, Syt 9, est également exprimée dans les neurones et semble présente sur les SV (Hudson and Birnbaum, 1995). Syt 9 est également exprimée dans un autre type de cellules sécrétoires, les RBL où elle est

localisée dans le compartiment endosomal de recyclage (ERC) et régule le trafic entre l'ERC et la membrane plasmique (Haberman et al., 2003; Haberman et al., 2005).

### 3.2. Syt 3, 5, 6 et 10

Les isoformes Syt 3, Syt 5, Syt 6 et Syt 10 forment une deuxième sous-famille. Ces isoformes sont capables de lier les phospholipides de manière dépendante du calcium (Rickman et al., 2004b). Les valeurs mesurées de l' $EC_{50}$  (concentration calcique obtenue pour la moitié de la liaison maximale) de la liaison pour le domaine C2A sont de l'ordre de 3 à 6  $\mu$ M (Li et al., 1995). Ces valeurs basses de l' $EC_{50}$  correspondent à une forte affinité de ces Syt pour le calcium. Leurs interactions avec le complexe hétérodimérique de t-SNARE présentent des affinités différentes pour le calcium suivant l'isoforme (Rickman et al., 2004b). Par exemple, Syt 3 fixe la syntaxine en présence de basses concentrations calciques ( $EC_{50} < 10 \mu$ M) alors que Syt 5 fixe la syntaxine pour des valeurs plus élevées en calcium similaires à Syt 1 ( $> 200 \mu$ M) (Li et al., 1995). Les membres de cette classe présentent de fortes affinités pour les phospholipides et les protéines SNARE, ils possèdent donc les caractéristiques nécessaires au rôle de senseur calcique (figure i-23). Cependant, la spécificité de ce groupe provient de leur incapacité à lier l' $IP_4$  (Ibata et al., 1998). Cet inositol polyphosphate se lie sur le domaine C2B de Syt 1 et perturbe le rôle de senseur calcique (Fukuda et al., 1995b). Le site de liaison de l' $IP_4$  dans les Syt est hautement conservé entre les vertébrés et les invertébrés. Il semble donc que le rôle de modulateur négatif de l' $IP_4$  soit important sur la fonction de senseur calcique des Syt sensibles à l' $IP_4$ . L'insensibilité à l' $IP_4$  des Syt 3, 5, 6 et 10 suggère une fonction distincte de ces isoformes.

Au niveau de l'expression de ces isoformes, seules Syt 3, Syt 5 et Syt 6 sont exprimées dans les îlots de Langerhans avec des distributions diverses en fonction du type cellulaire.

Syt 3 est exprimée dans les cellules  $\delta$  des îlots et localisée à la membrane plasmique ou proche de la membrane (Gut et al., 2001). Cette isoforme est également exprimée dans les cellules clonales RBL, où elle serait impliquée dans le transport entre les endosomes précoces et le compartiment de recyclage (Grimberg et al., 2003). Syt 6 est exprimée dans les cellules  $\beta$  de souris et les lignées dérivées (Gut et al., 2001) où elle pourrait être localisée au niveau de la membrane plasmique ou dans un compartiment proche de celle-ci (Butz et al., 1999). Syt 5 est exprimée et localisée sur les LDCV des cellules  $\alpha$ -pancréatiques de rat (Saegusa et al., 2002) et est également exprimée dans les lignées clonales dérivées des cellules  $\beta$  où elle



régulerait la sécrétion (Iezzi et al., 2004). Concernant Syt 10, peu de données sont connues. Il semblerait que son expression soit induite uniquement lors d'une crise d'épilepsie au niveau de deux zones particulières du cerveau, l'hippocampe et le cortex piriforme (Babity et al., 1997).

### 3.3. Syt 4 et 11

La spécificité de cette sous-classe réside dans la non conservation des résidus aspartates coordonnant la fixation du calcium au niveau des domaines C2. Syt 4 et Syt 11 présentent une substitution du troisième résidu aspartate par une sérine dans le domaine C2A. De plus, le domaine C2B de Syt 11 ne possède plus les 5 aspartates permettant la fixation du calcium. Ces différences au niveau de la séquence protéique confèrent des caractéristiques biochimiques particulières. Syt 4 n'est pas capable de fixer les phospholipides de manière dépendante du calcium (Bai et al., 2002; Rickman et al., 2004b; Robinson et al., 2002; von Poser et al., 1997), mais elle peut se lier au complexe t-SNARE en absence de calcium (Rickman et al., 2004b). Concernant Syt 11, cette isoforme ne présente aucune liaison aux phospholipides (von Poser et al., 1997) et la liaison aux protéine SNARE n'a pas été étudiée.

L'étude de la localisation cellulaire de ces deux isoformes a montré une localisation de Syt 4 à proximité du réseau *trans* de l'appareil de Golgi, appelé TGN (*trans Golgi Network*) dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques (Gut et al., 2001) et dans les cellules neuroendocrines PC12 (Fukuda et al., 2003). Cependant son rôle dans le trafic vésiculaire de ces cellules n'a pas été déterminé. Au niveau du cerveau, Syt 4 est également exprimée dans les neurones où son expression varie au cours du développement (Berton et al., 1997). Son expression est également induite lors d'une crise d'épilepsie (Vician et al., 1995). Récemment, Syt 4 a été impliquée dans un rôle de senseur calcique dans la région post-synaptique. Syt 4 permettrait la fusion des vésicules post-synaptiques et ainsi l'envoi d'un signal rétrograde vers la partie pré-synaptique pour stimuler la libération des neurotransmetteurs (Yoshihara et al., 2005). En revanche, la localisation cellulaire de Syt 11 n'est pas clairement établie (figure i-23). La fonction de cette isoforme reste encore inconnue bien qu'elle ait été récemment associée à la maladie de Parkinson. Elle constitue un des composants majeurs des corps de Lewy, retrouvés dans le cerveau des patients atteints de la maladie de Parkinson. Syt 11 pourrait intervenir dans le maintien de la fonction synaptique mais ce rôle reste encore à l'état d'hypothèse (Glass et al., 2004).

### 3.4. Syt 12, 13, 14, 15 et 16

Ce dernier groupe est composé des isoformes découvertes plus récemment. Les membres de cette famille n'ont pas l'ensemble des résidus aspartates permettant la coordination des ions  $\text{Ca}^{2+}$  (Craxton, 2004b; Fukuda, 2003a; Fukuda, 2003b) et donc ne possèdent pas la capacité de lier les phospholipides ou les SNARE de manière dépendante ou indépendante du calcium (Rickman et al., 2004b). La localisation sous-cellulaire et les propriétés biochimiques de ces isoformes n'ont pas encore fait l'objet d'études approfondies (figure i-23). Seule une étude sur Syt 13 a proposé un rôle de cette isoforme dans le transport constitutif entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique (Fukuda and Mikoshiba, 2001a).

### 3.5. Syt 8

Cette isoforme ne fait pas partie d'une sous-famille car elle présente des caractéristiques spécifiques. Elle ne possède pas tous les sites de coordination du calcium mais elle lie les phospholipides et les protéines SNARE de manière indépendante du calcium (Li et al., 1995; Rickman et al., 2004b; Tucker et al., 2003). L'étude de la localisation cellulaire de Syt 8 a montré une faible expression au niveau du cerveau mais une forte expression au niveau de l'épithélium du tubule rénal (Kishore et al., 1998) et de l'acrosome du spermatozoïde (Hutt et al., 2002) où elle semble réguler la réaction acrosomiale dans les spermatozoïdes (Hutt et al., 2005). L'expression de Syt 8 dans les îlots pancréatiques et les lignées de cellules  $\beta$  a été démontrée ainsi que l'effet inhibiteur de Syt 8 recombinant sur la sécrétion d'insuline dans des cellules  $\beta$  primaires perméabilisées (Gut et al., 2001). Syt 8 est donc un candidat éventuel au niveau des mécanismes de fusion dépendants du calcium.

### 3.6. Syt 7

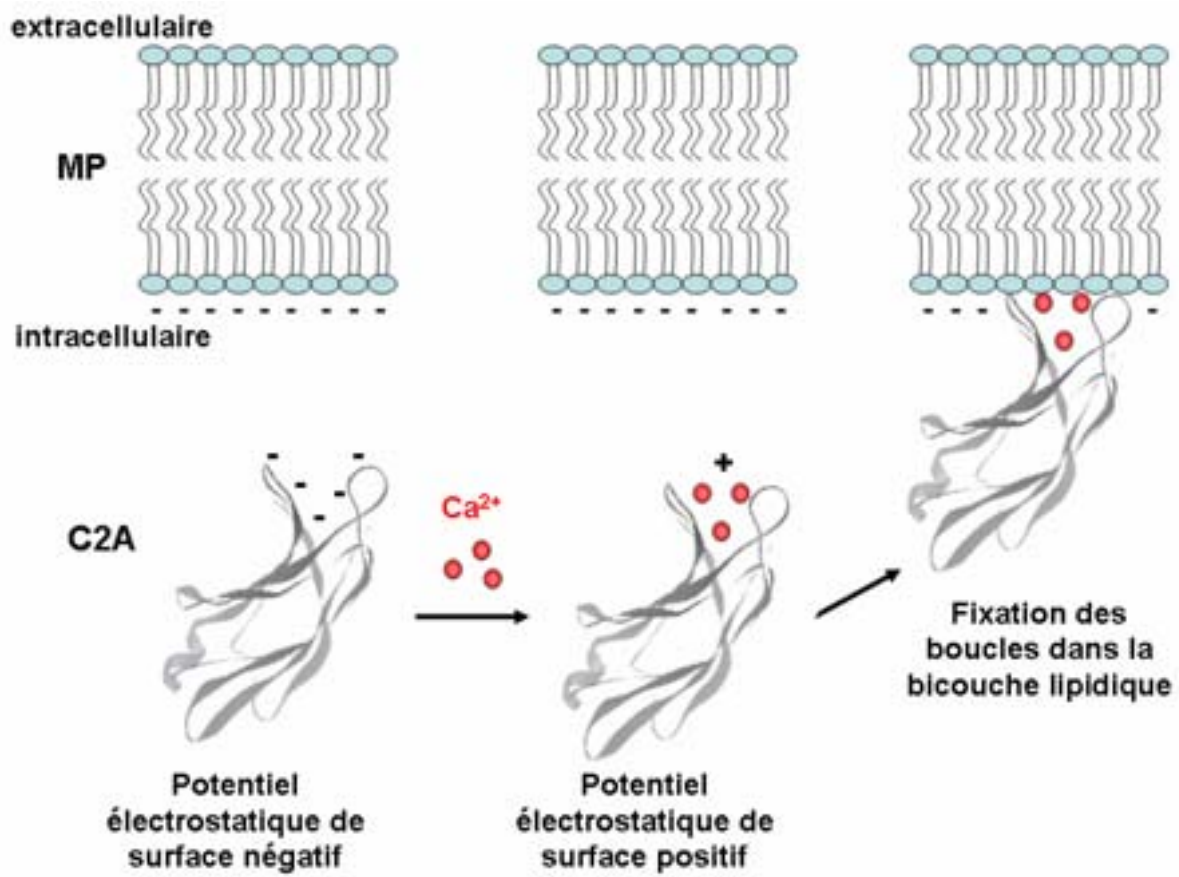
L'isoforme Syt 7 est également classée à part de ces quatre sous-familles. Elle est capable de fixer les phospholipides avec une forte affinité, la valeur de l' $\text{EC}_{50}$  pour cette liaison est de  $1,5 \mu\text{M}$  pour le domaine C2A et de  $2,5 \mu\text{M}$  pour le domaine C2B (Gut et al., 2001; Sugita et al., 2001; Sugita et al., 2002). De même, la fixation à la syntaxine est induite pour des valeurs basses de calcium ( $<10 \mu\text{M}$ ) avec une forte affinité. La liaison de Syt 7 au complexe t-SNARE peut aussi se faire en absence de calcium avec une forte affinité

(Rickman et al., 2004b). La caractéristique principale de cette isoforme est sa capacité d'oligomérisation dépendante du calcium qu'elle ne partage avec aucune autre isoforme (Fukuda and Mikoshiba, 2001b).

De nombreuses localisations sous-cellulaires ont été déterminées pour Syt 7 en fonction du type cellulaire. Dans les PC12, toutes les études de localisation ont été effectuées sur des cellules transfectées et Syt 7 est localisée dans différents compartiments selon les études. Les cellules transfectées ou surexprimant de manière stable Syt 7, présentent une localisation de Syt 7 au niveau du TGN et du compartiment endosomal précoce (Fukuda et al., 2002c; Sugita et al., 2001), proche ou à la membrane plasmique (Sugita et al., 2001), ainsi qu'au niveau des LDCV où Syt 7 régulerait l'exocytose dépendante du calcium (Fukuda et al., 2004; Wang et al., 2005). Dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques de rat et des lignées clonales, une approche de microscopie à faible résolution, a montré une co-localisation de Syt 7 endogène avec l'insuline (Gao et al., 2000). De même, l'application de protéines recombinantes Syt 7 inhibe la sécrétion dans les cellules insulino-sécrétoires (Gut et al., 2001). Il se pourrait donc que dans les cellules endocrines, Syt 7 soit localisée sur les LDCV où elle serait un senseur calcique lors de l'exocytose régulée par le calcium.

Dans les lignées non sécrétoires telles que les fibroblastes, Syt 7 est aussi le senseur calcique de l'exocytose mais au niveau des lysosomes (Arantes and Andrews, 2006; Rao et al., 2004; Reddy et al., 2001). En effet, Syt 7 endogène est localisée au niveau des lysosomes dans les cellules non sécrétoires telles que les fibroblastes et les macrophages (Caler et al., 2001; Chakrabarti et al., 2003; Jaiswal et al., 2004; Martinez et al., 2000). Récemment, une étude a montré le rôle de Syt 7 dans la fusion des lysosomes à la membrane plasmique lors de la phagocytose de grosses particules par les macrophages. L'exocytose des lysosomes régulée par le calcium permettrait un apport de membrane pour former le phagosome (Czibener et al., 2006).

Dans les neurones, plusieurs variants d'épissage de Syt 7 sont exprimés, et ils seraient impliqués dans le recyclage des vésicules synaptiques. L'expression d'un variant court ne possédant pas les domaines C2 accélère l'endocytose des vésicules synaptiques, alors que l'expression d'un variant long contenant les domaines C2 ralentit le recyclage des vésicules (Virmani et al., 2003a).



**Figure i-24 : Modèle de liaison  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante des domaines C2 sur les phospholipides**  
 Le domaine C2A contient au niveau des boucles, 5 aspartates et une sérine, chargés négativement. Lors de l'entrée du calcium dans la cellule, 3 ions calcium se fixent sur les boucles du domaine C2A par des liaisons ioniques. Le potentiel électrostatique de surface devient globalement positif et les boucles vont se fixer sur les phospholipides anioniques de la membrane plasmique (MP), chargés négativement.

Selon le type cellulaire, Syt 7 est localisée différemment et donc intervient dans différents types de trafic vésiculaire, celui des LDCV, des lysosomes et du recyclage vésiculaire.

## **B. Interactions fonctionnelles de Syt 1**

Plusieurs synaptotagmines sont impliquées dans différents types de trafic vésiculaire où leur capacité à lier les phospholipides et protéines SNARE est essentielle à leur fonction de senseur calcique. Afin de comprendre le mode d'action des synaptotagmines lors de ce rôle de senseur calcique, il est important de connaître les caractéristiques biochimiques de liaison aux phospholipides et aux SNARE de Syt 1 qui est l'isoforme la plus étudiée des synaptotagmines.

### **1. Interaction avec les phospholipides membranaires**

#### **1.1. Liaison aux phospholipides dépendante du calcium**

##### **1.1.1. Mécanisme de liaison des domaines C2**

La liaison du calcium sur le domaine C2A ne provoque pas de changements conformationnels de Syt 1, comme cela avait été proposé (Garcia et al., 2000) mais un changement de potentiel électrostatique de surface (Zhang et al., 1998b). Ce mécanisme diffère de celui de la PKC qui se lie aux phospholipides neutres en changeant de conformation (Edwards and Newton, 1997; Jimenez et al., 2003; Nalefski et al., 2001). A pH physiologique, les résidus aspartates des boucles des domaines C2 et la sérine 235 de Syt 1, sont chargés négativement, ce qui confère à la molécule un potentiel électrostatique de surface globalement négatif. Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  portant deux charges positives vont se lier par des liaisons ioniques au niveau des boucles des domaines C2. Le potentiel électrostatique de surface de la molécule devient alors globalement positif (Murray and Honig, 2002). Les boucles pénètrent dans la bicouche lipidique et se lient aux phospholipides anioniques, permettant ainsi la neutralisation du potentiel électrostatique (figure i-24) (Bai et al., 2004a).

### 1.1.2. Propriétés de liaison de chaque domaine C2

Plusieurs études ont analysé les propriétés biochimiques de liaison des domaines C2 de Syt 1 en présence de calcium afin de déterminer quel(s) domaine(s) est responsable de la fixation de Syt 1 aux phospholipides membranaires.

Ainsi, les domaines C2 isolés sont fusionnés à la glutathione-S-transférase (GST), et les protéines chimères sont incubées en présence de liposomes artificiels contenant un mélange de phospholipides : la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidylsérine (PS). La présence de phospholipides anioniques (PS) est indispensable car aucune liaison n'est observée avec des liposomes reconstitués ne contenant que la PC (Chapman and Jahn, 1994; Davletov and Sudhof, 1993).

Le domaine C2A de Syt 1 présente une forte capacité à fixer les phospholipides en présence de calcium, lorsqu'ils sont composés d'au moins 25 % de phosphatidylsérine (PS) (Chapman and Davis, 1998; Rickman et al., 2004b; Robinson et al., 2002; Wang et al., 2003b). Cette liaison entre le domaine C2A et les phospholipides, se fait avec une forte affinité pour le calcium ( $EC_{50}$  de 5  $\mu$ M) (Fukuda et al., 1996). De plus, le domaine C2A présente des affinités intrinsèques ( $\sim 50 \mu$ M et 500  $\mu$ M suivant le site de liaison au calcium et en absence de phospholipides) pour le calcium plus élevées que ses affinités apparentes ( $\sim 5-25 \mu$ M en fonction de la composition des liposomes reconstitués) en présence de phospholipides anioniques (Gerber et al., 2001). La présence des phospholipides stabilise donc le complexe Syt/ $Ca^{2+}$  et réduit les valeurs d'affinité intrinsèques ( $K_d$ ) pour le calcium de Syt 1.

Concernant le domaine C2B de Syt 1, des données contradictoires ont été publiées sur ses propriétés biochimiques, et cela en partie à cause de sa forte capacité à fixer des contaminants bactériens (ADN et ARN) (Ubach et al., 2001). En effet, lors de la production des protéines recombinantes dans les bactéries, des contaminants se lient aux protéines fusionnées à la GST.

De nombreuses études avaient conclu que la liaison  $Ca^{2+}$ -dépendante aux phospholipides par le domaine C2B était faible et que les boucles du domaine pénétraient dans la bicouche uniquement en présence du domaine C2A (Bai et al., 2002; Fernandez-Chacon et al., 2001; Wu et al., 2003). Cependant, ces résultats sont probablement dus à une mauvaise élimination des contaminants bactériens qui empêcheraient toute fixation spécifique. Une expérience très récente utilisant le domaine C2B purifié montre une fixation



Constructions de Syt 1	Affinité apparente aux PL en présence de Ca <sup>2+</sup>
C2A	++
C2B	++
C2A-C2B	++++
C2A <sub>M</sub> -C2B	+
C2A-C2B <sub>M</sub>	+
C2A <sub>M</sub> -C2B <sub>M</sub>	∅
C2A <sub>R233Q</sub> -C2B	Réduction de 50%
C2A-C2B <sub>région polybasique mutée</sub>	Réduction de 50%

**Figure i-25 : Coopération fonctionnelle des domaines C2**

Ce tableau récapitule l'effet des mutations dans les domaines C2 sur leur capacité de liaison aux phospholipides en présence de calcium. Les mutations (M) des aspartates (D3,4N) dans les boucles des domaines C2 inhibent la coordination des ions Ca<sup>2+</sup>. D'autres mutations (R233Q et région polybasique) des domaines C2 n'affectent pas directement la fixation des ions Ca<sup>2+</sup>. ∅ : Abolition totale de l'affinité apparente de Syt 1 aux phospholipides.

Constructions de Syt 1	Inhibition de la fusion membranaire
C2A <sub>M</sub> -C2B	++
C2A-C2B <sub>M</sub>	+++++
C2A <sub>M</sub> -C2B <sub>M</sub>	∅
C2A <sub>R233Q</sub> -C2B	Inhibition de 50%
C2A-C2B <sub>région polybasique mutée</sub>	Inhibition de 50%

**Figure i-26 : Importance relative des domaines C2 dans la fusion membranaire**

Les mutations des aspartates du domaine C2B (C2A-C2B<sub>M</sub>) affectent plus sévèrement la fusion membranaire que les mutations analogues dans le domaine C2A (C2A<sub>M</sub>-C2B). Les mutations des domaines C2 autres que les sites de coordination du calcium inhibent à 50 % la fusion membranaire. ∅ : Inhibition totale de la fusion.



du domaine C2B aux phospholipides pour des concentrations supérieures à 50 nM de  $\text{Ca}^{2+}$  (Arac et al., 2006). De plus, les boucles liant les ions  $\text{Ca}^{2+}$  pénètrent dans la bicouche lipidique sans l'assistance du domaine C2A (Arac et al., 2006; Rufener et al., 2005).

Les deux domaines C2 lient donc les phospholipides de façon dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  (Fernandez et al., 2001; Shin et al., 2004; Shin et al., 2003; Sugita et al., 2002; Ubach et al., 2001) et sont tous les deux responsables de la liaison de Syt 1 aux phospholipides membranaires.

### 1.1.3. Coopération fonctionnelle des domaines C2

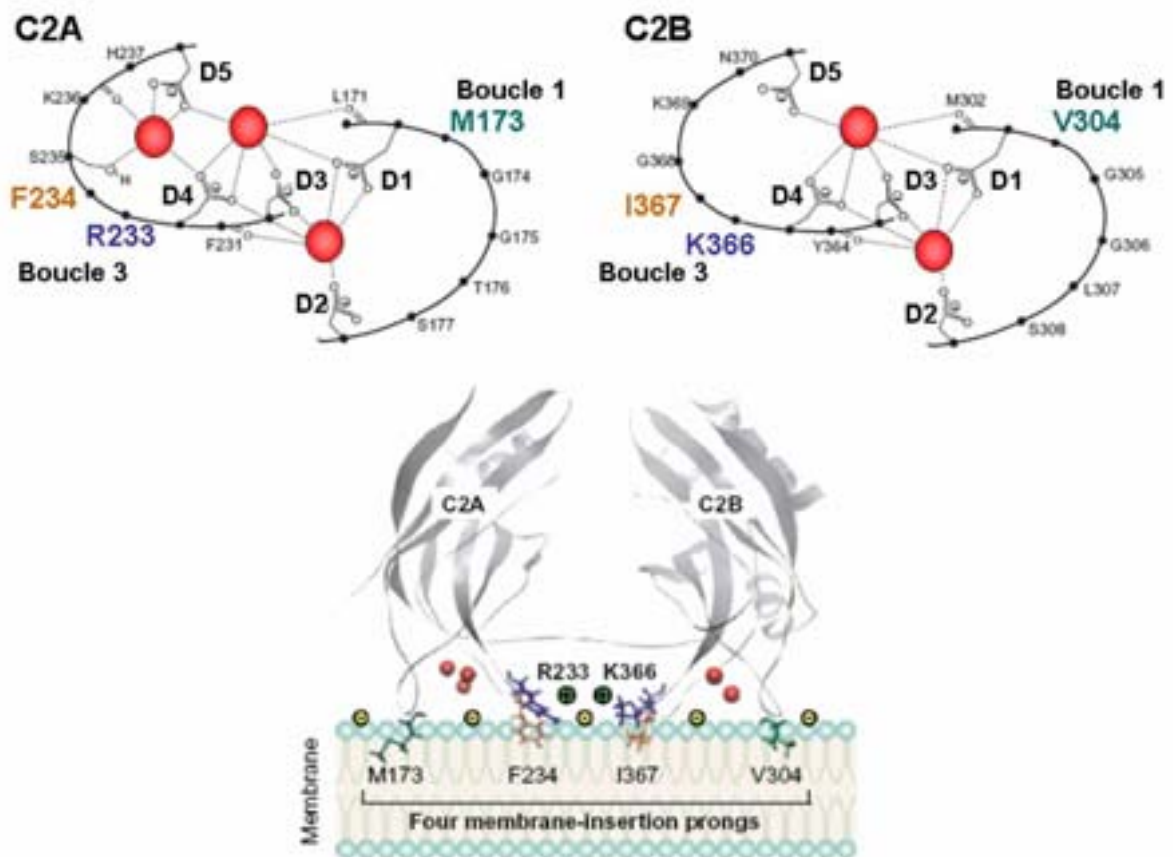
La coopération fonctionnelle des domaines C2 a été récemment mise en évidence. Elle se manifeste sur deux propriétés de Syt 1 : l'affinité apparente pour le calcium et les phospholipides et la fixation aux phospholipides.

Premièrement, la présence des deux domaines C2 induit une augmentation de l'affinité de la protéine vis-à-vis du  $\text{Ca}^{2+}$  et des phospholipides (Bai et al., 2002; Earles et al., 2001; Hui et al., 2006). L'affinité intrinsèque (en absence de phospholipides) de la protéine contenant les deux domaines C2 est de  $K_d \sim 60 \mu\text{M}$ , alors que les valeurs pour les domaines isolés sont quasiment dix fois plus grandes (C2A :  $K_d \sim 0,4-1 \text{ mM}$  et C2B :  $K_d \sim 300-600 \mu\text{M}$ ) (Fernandez et al., 2001; Ubach et al., 1998).

Deuxièmement, l'abolition complète de la fixation de Syt 1 aux liposomes PC/PS nécessite la mutation des sites de liaison du calcium au niveau des deux domaines C2 (Earles et al., 2001). Cette expérience a été la première preuve de la coopération fonctionnelle entre les deux domaines C2. Depuis, plusieurs études menées sur les domaines C2, ont renforcé l'idée d'une coopération fonctionnelle entre les domaines C2A et C2B (Rhee et al., 2005; Wang et al., 2003b). Aussi, la mutation d'un domaine C2 affecte les propriétés de fixation du calcium de l'autre (Wang et al., 2003b) (figure i-25).

### 1.1.4. Importance relative des domaines dans la fusion membranaire

Plusieurs études se sont intéressées à l'importance des deux domaines C2 de Syt 1 dans le mécanisme de fusion des membranes (figure i-26). Il apparaît que le domaine C2B tient un rôle fondamental. Les mutations au niveau des sites de liaison des ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans le domaine C2B affectent plus sévèrement l'exocytose que les mutations analogues dans le



**Figure i-27 : Mécanismes d'insertion de Syt 1 dans la bicouche lipidique**

Modèle moléculaire de la liaison  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante de Syt 1 avec une bicouche lipidique constituée de PS/PC. Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  (en rouge) se lient aux résidus aspartates (D) des boucles de chaque domaine, permettant ainsi une liaison électrostatique entre les domaines C2 globalement positifs et les charges négatives des phospholipides. Quatre résidus hydrophobes (M173, F234, V304 et I367) localisés sur les boucles 1 et 3 des domaines, pénètrent dans la bicouche lipidique en présence de calcium. Deux autres résidus chargés positivement (en bleu), une arginine (R233) et une lysine (K366), jouent un rôle crucial dans l'interaction  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante de Syt 1 aux phospholipides.

Adapté de (Bai and Chapman, 2004)

domaine C2A (Mackler et al., 2002; Nishiki and Augustine, 2004a). Le domaine C2B doit posséder une propriété spécifique à l'origine de son rôle prépondérant. Cette particularité ne serait pas partagée par le domaine C2A et serait liée à sa liaison aux phospholipides  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante. Récemment, une étude utilisant des liposomes contenant des phospholipides anioniques, et les domaines C2 isolés, a montré que l'ajout du domaine C2B permettait l'obtention d'une floculation de liposomes se traduisant par un rapprochement étroit des membranes (~4 nm). Le haut potentiel électrostatique positif de surface de C2B serait suffisant pour permettre le rapprochement des membranes (Arac et al., 2006). Cette particularité viendrait de la région polybasique du C2B. D'ailleurs, de récents travaux de mutagenèse ont montré que la mutation de la région polybasique du domaine C2B diminuait l'affinité de Syt 1 pour le calcium ainsi que la sécrétion dépendante du calcium. Les effets de cette mutation sont semblables à ceux provoqués par la mutation (R233Q) au niveau des boucles du domaine C2A (Li et al., 2006). Cette étude a mis en évidence une remarquable corrélation entre l'affinité apparente de Syt 1 pour le  $\text{Ca}^{2+}$  en présence de phospholipides *in vitro* et la sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  de la libération du neurotransmetteur *in vivo*.

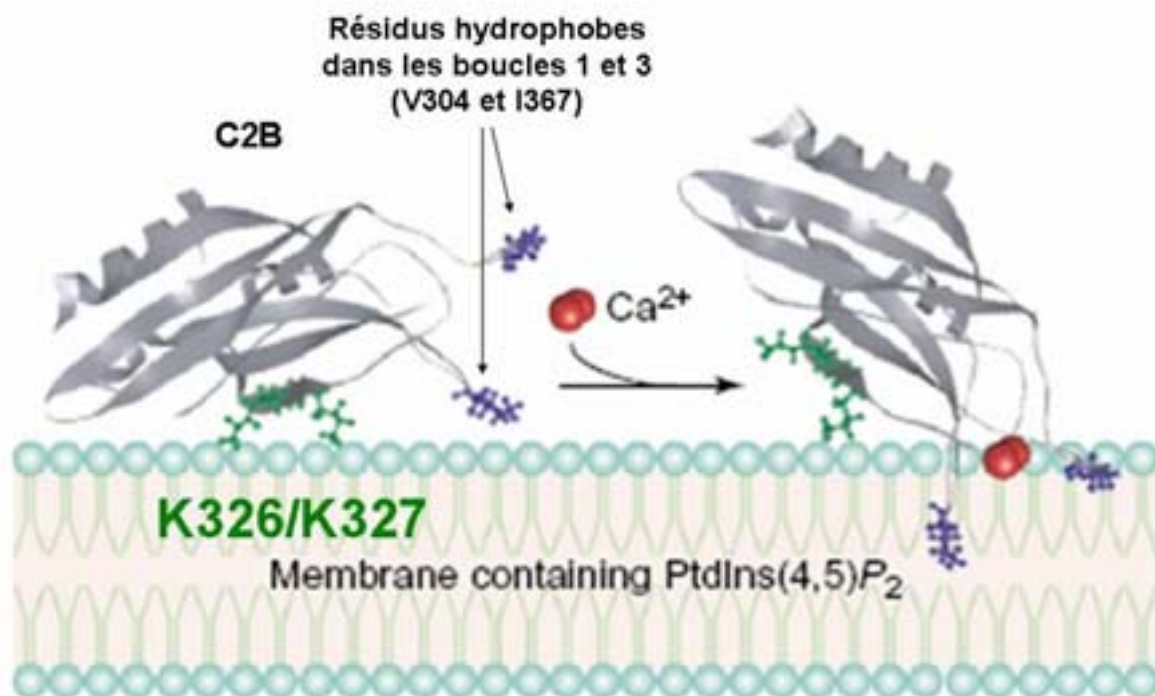
#### 1.1.5. Interaction par des résidus autres que les aspartates des boucles

Parallèlement à la liaison des boucles des domaines C2 aux phospholipides qui est provoquée par la présence des ions calcium, d'autres résidus peuvent lier les phospholipides par des interactions hydrophobes ou ioniques (figure i-27).

Tout d'abord, quatre résidus hydrophobes sont localisés au niveau des boucles et participent aussi à la fixation aux phospholipides. La méthionine en position 173, la phénylalanine en position 234, la valine en position 304 et l'isoleucine en position 367 peuvent pénétrer dans la bicouche (Fernandez-Chacon et al., 2002) sur une profondeur d'environ 5 Å (Frazier et al., 2003) suite à la liaison des domaines C2 via le calcium.

De plus, au niveau des domaines C2, se trouvent deux résidus basiques chargés positivement en position 233 et 366 (R233 et K366), qui peuvent établir des liaisons ioniques avec la membrane plasmique (Wang et al., 2003b).

Ces deux types de liaison sont créés lorsque les domaines C2 se rapprochent des membranes grâce au changement du potentiel électrostatique de surface par les ions  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figure i-28 : Interactions du domaine C2B dans la liaison aux membranes**

Le domaine C2B se lie aux membranes constituées de phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) par deux types d'interactions distinctes. Premièrement, les lysines K326 et K327 (en vert) du domaine C2B se lient aux PIP<sub>2</sub> en absence de Ca<sup>2+</sup>. Puis, les ions Ca<sup>2+</sup> se fixent sur les boucles qui vont se lier aux membranes et permettre la pénétration dans la bicouche, des résidus hydrophobes (en bleu, V304 et I367) localisés sur les boucles du domaine C2B.

Adapté de (Bai and Chapman, 2004)

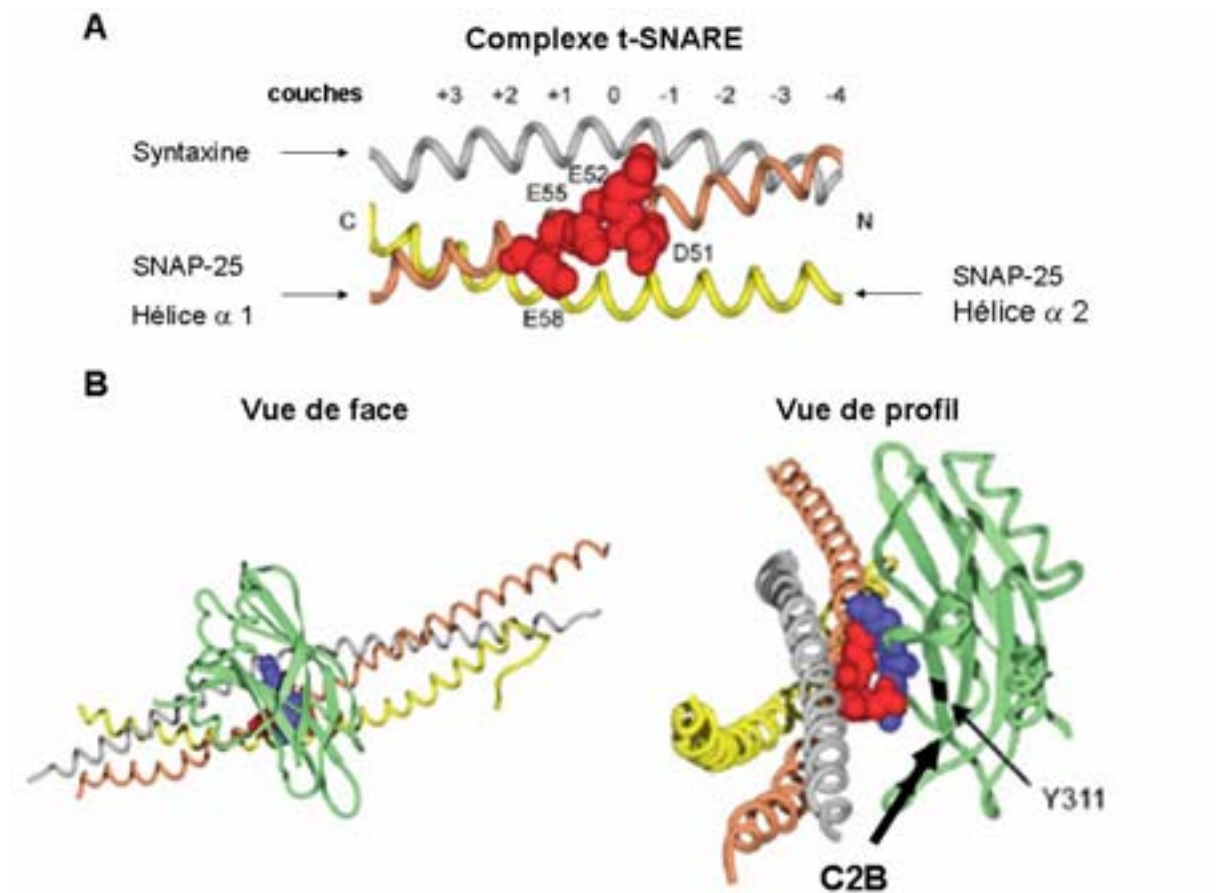
## 1.2. Liaison aux phospholipides indépendante du calcium

Un autre type de liaison existe entre le domaine C2B et la membrane plasmique qui lui est totalement indépendant de la présence des ions calcium. En effet, le domaine C2B de Syt 1 interagit avec les phospholipides anioniques de type PIP<sub>2</sub> et le second messenger IP<sub>4</sub>, en absence de calcium, grâce à la région polybasique située dans le 4<sup>ème</sup> feuillet  $\beta$  du domaine C2B (Arac et al., 2006; Bai et al., 2004a; Fukuda et al., 1994; Fukuda et al., 1995a; Schiavo et al., 1996). Cette liaison passe essentiellement par deux lysines, K326 et K327, situées dans la région polybasique (Bai et al., 2004a). L'interaction entre le domaine C2B et la membrane plasmique permet de positionner les boucles du domaine C2B à proximité des membranes. Ainsi, lorsque les ions Ca<sup>2+</sup> entre dans la cellule, les boucles pénètrent rapidement dans les membranes (figure i-28) (Bai et al., 2004a).

Les PIP<sub>2</sub> sont majoritairement présents dans les membranes plasmiques des neurones et des cellules neurosécrétoires (Holz et al., 2000; Micheva et al., 2001) et sont les précurseurs de l'IP<sub>4</sub> et du DAG. La capacité du domaine C2B à fixer les PIP<sub>2</sub>, constituants des membranes plasmiques, est intéressante car les études *in vitro* ne peuvent pas répondre à la question de l'orientation de la liaison de Syt 1 avec les phospholipides. Cette liaison se fait-elle en *trans* (avec les phospholipides de la membrane plasmique) ou en *cis* (avec la membrane vésiculaire)? Lorsque les membranes *cis* et *trans* sont toutes les deux composées de PS (25 % PS / 75% PC), Syt 1 pénètre dans la membrane où elle est accrochée, c'est-à-dire en *cis* (Bai et al., 2000). Cette liaison peut être simplement expliquée par la plus grande probabilité de rencontre en *cis* qu'en *trans*. Ces observations ne permettent pas de trancher entre les deux modes d'action de Syt 1 mais elles révèlent la capacité de Syt 1 à se replier vers la membrane sur laquelle elle est ancrée. Si le modèle actuel de liaison de Syt 1 avec les membranes en *trans* est réel, il est envisageable que l'attachement de Syt 1 aux PIP<sub>2</sub> permette de reconnaître la membrane plasmique et de localiser les vésicules à la membrane plasmique.

## 2. Interaction avec les protéines du complexe SNARE

Le complexe SNARE peut à lui seul déclencher la fusion de liposomes artificiels, il constitue le complexe minimal de fusion des membranes (Weber et al., 1998). L'ajout *in vitro* de Syt 1 accélère significativement le mécanisme de fusion en réponse au calcium (Bhalla et al., 2006). Il a donc été envisagé que la protéine Syt 1 interagit avec un ou tous les constituants du complexe SNARE, de façon dépendante ou indépendante du calcium.



**Figure i-29 : Modèle de liaison entre le domaine C2B de Syt 1 et le complexe t-SNARE**

**A-** Représentation schématique du complexe t-SNARE formé par la syntaxine (en gris) et les deux hélices  $\alpha$  de la SNAP-25 (hélice  $\alpha$ 1 en orange et hélice  $\alpha$ 2 en jaune). Les acides aminés D51, E52, E55 et E58 sont représentés en rouge. Les résidus D51 et E52 sont localisés au niveau de la couche 0 de la structure tridimensionnelle. Ces acides aminés sont impliqués dans l'association du domaine C2B de Syt 1 au complexe SNARE.

**B-** Modèle d'interaction entre les résidus de la région polybasique (en bleu) du domaine C2B de Syt 1 (en vert) et le complexe t-SNARE. Les résidus lysine, K326 et K327 (en bleu) interagissent avec les résidus de SNAP-25 (D51, E52, E55) par des liaisons électrostatiques. Selon ce modèle, le résidu Y311, qui correspond au résidu muté dans la mutation AD3 chez la drosophile, pourrait aussi intervenir dans cette liaison.

Adapté de (Rickman et al., 2006)

## 2.1 Liaison de Syt 1 avec la syntaxine 1

L'interaction entre Syt 1 et la syntaxine 1 a été initialement montrée par immunoprécipitation de Syt 1 à partir d'extraits de cerveau de rat. D'autres études ont montré que cette interaction est régulée par le calcium et qu'elle permet le couplage avec l'exocytose (Chapman et al., 1995; Earles et al., 2001; Li et al., 1995; Wang et al., 2003b; Zhang et al., 2002). Syt 1 lie aussi la syntaxine 1 de façon indépendante du calcium et cette liaison est fortement augmentée en présence de calcium. L'association entre la syntaxine et Syt 1 passe par des interactions au niveau de deux domaines différents de la région carboxy-terminale de la syntaxine (Kee and Scheller, 1996; Shao et al., 1997) et par les domaines C2 de Syt 1 (Rickman et al., 2006).

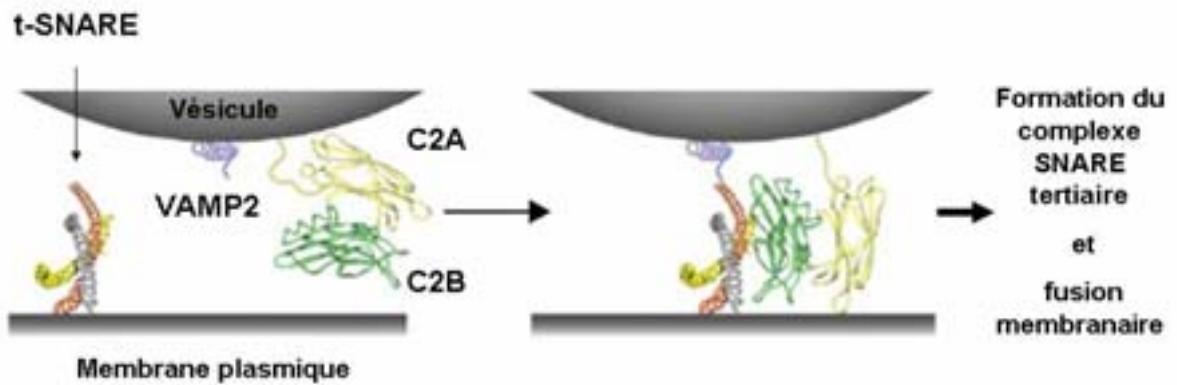
## 2.2 Liaison de Syt 1 à SNAP-25

Lors de la formation du complexe SNARE, la syntaxine 1 et la SNAP-25 s'associent pour former un complexe dimérique de forte affinité appelé complexe t-SNARE. La fixation de VAMP2 se fait secondairement pour former le complexe tertiaire SNARE.

Syt 1 se lie à la syntaxine 1 mais s'associe également à la SNAP-25. Cette liaison existe en absence de calcium mais elle est fortement augmentée après l'ajout de calcium (Gerona et al., 2000). Plusieurs études décrivent aussi que l'association de Syt 1 se fait uniquement sur le complexe dimérique préformé de t-SNARE, constitué de la syntaxine et de SNAP-25 (Bai et al., 2004b; Gerona et al., 2000; Rickman et al., 2004a; Rickman et al., 2004b; Rickman and Davletov, 2003).

L'interaction de SNAP-25 et Syt 1, lorsque SNAP-25 est associée en complexe dimérique, passe par plusieurs résidus de SNAP-25. Les résidus D51, E52 et E55 de SNAP-25 (numérotation chez le rat) sont présents à la surface exposée de SNAP-25 lorsqu'elle est engagée dans le complexe SNARE (Rickman et al., 2004a; Rickman et al., 2006) et sont impliqués dans la liaison du complexe SNARE avec Syt 1 (Rickman et al., 2006) (figure i-29).

Au niveau de Syt 1, c'est la région polybasique riche en résidus lysine (7 résidus lysine (K) sur 12 acides aminés) du domaine C2B qui est impliquée dans l'interaction avec les résidus D51, E52 et E55 de SNAP-25. La mutation de deux résidus K326 et K327 en glutamine suffit à diminuer de 80 % la liaison indépendante du calcium de la protéine recombinante Syt 1 C2AB avec le dimère SNAP-25/syntaxine 1 (Rickman et al., 2004a).



### Figure i-30 : Modèle d'action de la liaison de Syt 1 aux protéines SNARE

En absence de calcium, les protéines t-SNARE, la syntaxine 1 (en gris) et SNAP-25 (hélice  $\alpha 1$  en orange et hélice  $\alpha 2$  en jaune), sont préassemblées en complexe sur la membrane plasmique. Syt 1, par son domaine C2B (en vert), interagit avec le complexe t-SNARE et permet ainsi le rapprochement de la vésicule vers la membrane plasmique. La protéine VAMP2 (en bleu) se retrouve à proximité du complexe t-SNARE et peut s'y lier pour former le complexe tertiaire. L'arrivée de calcium déclenchera par la suite la fusion membranaire.

Adapté de (Rickman et al., 2006)



Cependant cette mutation n'affecte pas la capacité de lier les phospholipides de manière dépendante du calcium ni l'exocytose régulée. Le domaine polybasique dans le domaine C2B de Syt 1 permet donc essentiellement la liaison avec le complexe dimérique t-SNARE en absence de calcium (figure i-29).

Deux autres résidus de Syt 1, R233 et K366 semblent être également impliqués dans la liaison de Syt 1 à SNAP-25 (Wang et al., 2003b). Cette interaction passerait par des liaisons avec les résidus chargés négativement (D51, E52 et E55) de SNAP-25. En effet, les mutations des résidus R233 et K366 diminuent de 50 % la capacité de fixation de Syt 1 à SNAP-25, et diminuent l'exocytose régulée (Li et al., 2006; Wang et al., 2003b).

D'après ce modèle d'interaction entre SNAP-25, la syntaxine 1 et Syt 1, le résidu Y311 (correspondant au résidu muté dans la mutation AD3) de Syt 1 semble intervenir dans cette association.

### 2.3 Liaison de Syt 1 à VAMP2

Syt 1 se lie au complexe SNARE mais elle n'interagit pas directement avec la troisième protéine SNARE, VAMP2 (Gerona et al., 2000). Lors de la formation du complexe SNARE, les protéines t-SNARE, syntaxine et SNAP-25 s'associent en précomplexe puis VAMP2 se lie uniquement au complexe préformé avec une forte affinité (Hayashi et al., 1994). De plus, le site de liaison de VAMP2 sur le complexe t-SNARE est distinct de celui de Syt 1 (Rickman et al., 2006) ce qui permet une interaction indirecte entre Syt 1 et VAMP2.

### 2.4 Rôle fonctionnel de l'interaction entre Syt 1 et le complexe SNARE

L'association de Syt 1 au complexe t-SNARE est donc indispensable à la régulation de l'exocytose par le calcium. Syt 1 se lie à la membrane plasmique via deux types d'association : un lien direct avec les phospholipides de la membrane et une interaction avec les protéines SNARE.

D'après plusieurs données, il semblerait que le rôle fonctionnel de l'association entre Syt 1 et certains composants du complexe SNARE serait de faciliter la formation de ce complexe. En effet, des mutations dans la protéine Syt 1 bloquent l'assemblage du complexe SNARE et le domaine cytoplasmique de Syt 1 facilite l'assemblage du complexe *in vivo* et *in vitro* (Littleton et al., 2001). D'après ces observations faites sur les interactions entre Syt 1 et les protéines SNARE, un modèle a été proposé en figure i-30. Les protéines t-SNARE

s'associent en complexe dimérique au niveau de la membrane plasmique. La vésicule synaptique qui porte Syt 1 et VAMP2 à sa surface, arrive à proximité de la membrane plasmique. Syt 1 s'associe au complexe dimérique essentiellement grâce à la région polybasique de son domaine C2B. Cette interaction permet à la membrane vésiculaire de se rapprocher de la membrane plasmique et à VAMP2 de se lier au complexe dimérique afin de former le complexe tertiaire de fusion. Ces observations sont compatibles avec un rôle éventuel de la liaison entre Syt 1 et SNAP-25 dans l'étape réversible de *Tethering* des vésicules de sécrétion (Chieragatti et al., 2002).

## 2.5 Dépendance calcique de la fixation de Syt 1 au complexe SNARE

Syt 1 se lie aux phospholipides de manière indépendante du calcium puis après une augmentation de la concentration de calcium, cette interaction est fortement augmentée. Parallèlement, Syt 1 se lie au complexe t-SNARE et participe à la formation du complexe tertiaire.

Récemment la fixation en absence de calcium de Syt 1, par son domaine C2B, sur le complexe t-SNARE a été démontrée. Cette interaction en absence de calcium, pourrait préparer la fusion afin que le délai de réponse soit très court en réponse à l'entrée du calcium (Rickman et al., 2006). Pour valider cette hypothèse, une étude a montré que dans des ovocytes co-exprimant les protéines SNARE et le domaine cytosolique de Syt 1 couplé à la GFP (*Green Fluorescent Protein*), la protéine de fusion est localisée au niveau de la membrane plasmique. Cette observation permet d'envisager un lien direct entre le complexe SNARE et Syt 1 sans augmentation de la concentration calcique (Cohen and Atlas, 2004).

Cependant, des données un peu contradictoires ont été publiées. Une étude a utilisé, la technique de *single molecule FRET* qui permet de visualiser une forte proximité entre deux molécules. Cette approche a montré une forte augmentation des interactions entre Syt 1 et le complexe après élévation de la concentration calcique. D'après cette expérience, le domaine C2B interagit très fortement avec la partie proximale à la membrane plasmique des SNARE, uniquement en présence de calcium. Alors que le domaine C2A interagit très faiblement avec le complexe (Bowen et al., 2005).

La dépendance calcique de la fixation de Syt 1 au complexe t-SNARE n'est pas encore élucidée. Il est clairement établi que la fixation de Syt 1 participe à la formation du complexe

SNARE, et que la fixation de Syt 1 sur la phosphatidylsérine (PS) facilite aussi l'assemblage du complexe SNARE (Bhalla et al., 2006).

## C. Interactions structurales de Syt 1

### 1. Liaison de Syt 1 aux canaux calciques dépendants du voltage

#### 1.1. Mise en évidence de l'interaction entre Syt 1 et les canaux calciques

Dans les neurones, la libération des neurotransmetteurs est déclenchée par l'exocytose des vésicules synaptiques induite par le calcium. L'arrivée d'un potentiel d'action au niveau de la région présynaptique dépolarise la membrane plasmique et provoque l'ouverture des canaux calciques voltages dépendants (VDCC). L'activation des canaux permet l'entrée de calcium qui induit la fusion des vésicules synaptiques. Comme nous l'avons vu dans la Partie I Chapitre C.3, les canaux calciques dépendants du voltage sont constitués d'une sous-unité  $\alpha 1$  formée par la répétition de quatre domaines (I à IV), chacun composé de six domaines transmembranaires. Les différents domaines sont reliés par des boucles cytoplasmiques capables d'engager des liaisons protéiques. D'ailleurs, les VDCC interagissent avec les protéines SNARES (syntaxine et SNAP25) et Syt 1. En effet, Syt 1 interagit directement avec une grande variété de canaux calciques. Les liaisons de Syt 1 avec les canaux calciques type N, P/Q et L ont été démontrées par des expériences d'immunoprécipitation associées à une étude de liaison *in vitro* avec des protéines recombinantes (Charvin et al., 1997; Fisher and Bourque, 2001; Leveque et al., 1994; Wiser et al., 1999). La liaison entre Syt 1 et le canal VDCC de type L s'établit entre la boucle cytoplasmique reliant le deuxième et le troisième domaine de la sous-unité  $\alpha 1$ , appelée « *synprint* » (Catterall, 1999), et Syt 1 (Wiser et al., 1999). Cette interaction semble jouer un rôle fonctionnel important dans l'exocytose puisque l'introduction du peptide correspondant au *synprint* dans les neurones réduit l'exocytose (Rettig et al., 1997). De même, dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques, la libération d'insuline est déclenchée suite à une entrée de calcium par les canaux calciques de type L, et l'injection du peptide dans ces cellules, inhibe fortement l'exocytose (Wiser et al., 1999). Ces observations indiquent l'importance d'une interaction entre les synaptotagmines vésiculaires (Syt 1 dans les neurones et une autre isoforme dans les cellules  $\beta$ ) et les canaux calciques de type L, dans l'exocytose régulée.

## 1.2. Rôles fonctionnels de l'interaction Syt 1 et VDCC

L'interaction de Syt 1 avec la sous-unité  $\alpha 1$  du VDCC de type L permet de proposer deux grands rôles fonctionnels dans la sécrétion des LDCV dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques.

La première fonction de cette interaction, consisterait en un recrutement de Syt 1 par le canal calcique pour former un complexe appelé excitosome avant l'influx calcique (Cohen and Atlas, 2004). Ce complexe multiprotéique est formé de la machinerie de sécrétion (t-SNARE et Syt) et des VDCC de type L. Des études d'expression dans des ovocytes de Xénope ont montré que la formation de ce complexe était nécessaire à l'obtention d'une dépolarisation effective permettant de déclencher l'exocytose (Atlas, 2001; Atlas et al., 2001). Par ce même type d'expérience, il a été montré que le ratio d'expression entre la syntaxine 1 et Syt 1 régulaient les propriétés cinétiques du canal calcique de type L (Atlas et al., 2001; Cohen et al., 2003). La syntaxine 1, par sa liaison au canal de type L est capable de réduire l'amplitude du courant des ions  $Ba^{2+}$  stimulé par une dépolarisation membranaire unique, et la présence de Syt 1 peut contrer à 50 % cette réduction (Cohen et al., 2003). Ceci valide l'existence d'un complexe multiprotéique contenant au moins la syntaxine 1, Syt 1 et le canal calcique de type L. Cette association en complexe pourrait également jouer un rôle dans le *tethering* des vésicules d'exocytose au niveau des sites de libération (Catterall, 1999).

L'autre aspect fonctionnel de cette association est de permettre aux vésicules d'être attachées à la membrane plasmique au niveau de sites riches en canaux calciques dans les synapses. Ainsi, les vésicules sont localisées à des endroits où localement la concentration calcique atteint des valeurs permettant le déclenchement de la fusion des vésicules. En outre, cette localisation permet une détection rapide de l'entrée du calcium et le déclenchement d'une fusion des vésicules dans un délai très court (0,2 à 0,5 ms) (Wiser et al., 1999), compatible avec la vitesse de la neurosécrétion observée *in vivo*.

## 2. Oligomérisation dépendante du calcium

La famille des synaptotagmines contient plusieurs membres et certaines isoformes, telles que Syt 1 et Syt 2, sont localisées à la surface des mêmes vésicules. Ainsi l'hypothèse qu'une isoforme pourrait se lier à une autre isoforme de Syt et former des hétéro-oligomères a été proposée. Dans ce cas, chaque hétéro-oligomère présenterait des propriétés distinctes de

liaison aux effecteurs et permettrait une régulation fine des étapes du trafic membranaire dans différentes cellules et différents compartiments sous-cellulaires.

L'oligomérisation de Syt 1 a été mise en évidence *in vivo*, par immunoprécipitation (Osborne et al., 1999). Cependant le domaine C2B qui avait été initialement impliqué dans l'oligomérisation  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante de Syt 1 (Chapman et al., 1998), par sa région polybasique (K326 et K327), a récemment été montré comme ne s'oligomérisant pas (Arac et al., 2006; Ubach et al., 2001). D'ailleurs, la capacité d'oligomérisation des protéines recombinantes en solution, après élimination des contaminants bactériens, n'est pas toujours reproduite *in vivo* par immunoprécipitation. Des travaux ont montré que le domaine C2B peut médier l'oligomérisation de Syt 1 lorsque Syt 1 lie les phospholipides. Il a été proposé à partir d'observations en microscopie électronique que *in vitro* les contaminants bactériens miment la présence des phospholipides et induisent l'oligomérisation de Syt 1 via le domaine polybasique du domaine C2B (Wu et al., 2003). Les expériences de FRET, cross-linking et de cryomicroscopie électronique ont également montré que la synaptotagmine 1 ne s'oligomérisent pas sur des vésicules de phospholipides (Arac et al., 2006).

#### **D. Syt 1 : senseur calcique de la transmission synaptique**

Les caractéristiques biochimiques de Syt 1, à savoir la fixation aux phospholipides de manière dépendante du calcium et la liaison aux protéines SNARE, ont permis de proposer que cette protéine des vésicules synaptiques soit le senseur calcique de la neurosécrétion (Brose et al., 1992). Chez les invertébrés *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans* ne présentant plus d'expression de Syt 1 (KO pour le gène), une forte inhibition de la sécrétion déclenchée par le  $\text{Ca}^{2+}$  est observée, montrant ainsi l'importance fonctionnelle de Syt 1 dans la libération des neurotransmetteurs (DiAntonio et al., 1993; Littleton et al., 1993; Nonet et al., 1993). Cependant, chez ces mutants et chez les souris KO pour Syt 1, une libération résiduelle de neurotransmetteurs persiste, ce qui suggère l'implication d'une autre protéine dans le rôle de senseur calcique de la neurosécrétion (Fernandez-Chacon et al., 2001; Geppert et al., 1994). Il a également été proposé que Syt 1 joue un rôle dans le *docking* ou le recyclage des vésicules de sécrétion.

## 1. Rôle de Syt 1 dans les étapes préfusionnelles des vésicules

Les vésicules de sécrétion matures constituant le pool de réserve (RP) sont transportées vers la membrane plasmique puis elles sont attachées à la membrane au niveau du site d'exocytose lors du *tethering*. Le *docking* des vésicules permet de stabiliser la fixation des vésicules puis le *priming* rend les vésicules compétentes à la fusion. Ainsi lors de l'entrée massive du calcium, les vésicules RRP (*Readily releasable pool*) sont prêtes à fusionner avec la membrane plasmique. Ces différentes étapes sont dépendantes du calcium et nécessitent l'apport d'énergie.

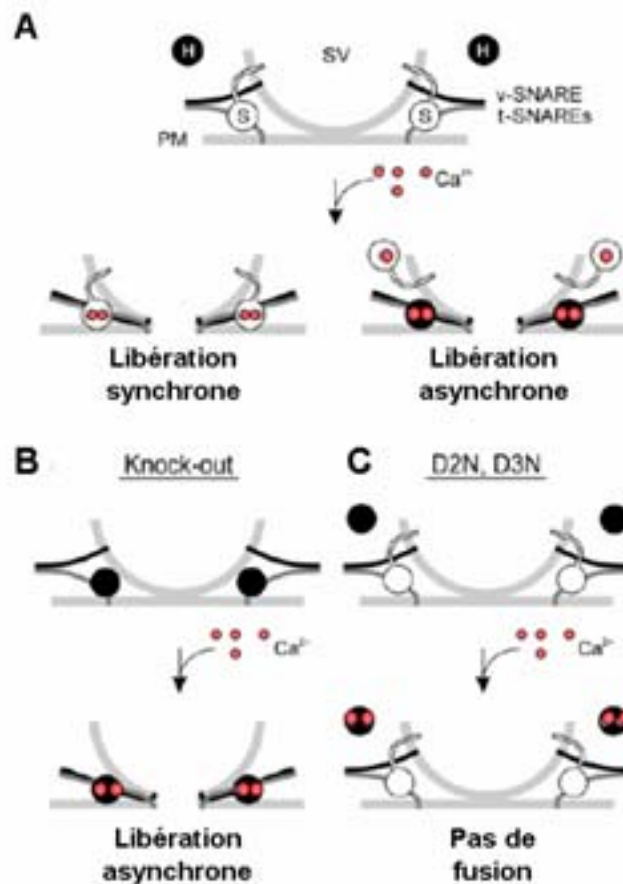
Lors du *docking* des vésicules, Syt 1 stabilise les vésicules à proximité de la membrane. En effet, une analyse morphologique par microscopie électronique de larves de drosophile KO pour le gène de Syt 1, a permis de mettre en évidence une légère diminution du nombre total de vésicules synaptiques et une réduction importante (~24 %) du pool de vésicules adjacentes à la membrane plasmique (RRP) (Reist et al., 1998). La présence de Syt 1 permet donc le recrutement des vésicules RRP à partir du pool de réserve. Des résultats similaires ont été obtenus chez des larves portant un allèle muté (AD3). Cette mutation correspond à la substitution de la tyrosine 311 en asparagine (Y311N chez le rat) dans le domaine C2B (DiAntonio and Schwarz, 1994) ce qui réduit sa capacité de fixation du  $Ca^{2+}$  (Littleton et al., 2001) et donc sa capacité à recruter les vésicules à la membrane. Syt 1 est donc impliquée dans le *docking* des vésicules de façon calcium-dépendante. Cette fonction dépend également de l'interaction dépendante du  $Ca^{2+}$  entre Syt 1 et SNAP-25 (Chierregatti et al., 2002).

Ainsi, Syt 1 interviendrait lors du *docking* des vésicules (Szule and Coorssen, 2003; Voets et al., 2001) en stabilisant les vésicules à proximité de la membrane plasmique au niveau du site d'exocytose pour qu'elles fusionnent et libèrent leur contenu dans l'espace synaptique.

## 2. Fonctions de Syt 1 dans la fusion des vésicules présynaptiques

Dans les neurones, l'exocytose des neurotransmetteurs se fait selon deux modes : la libération synchrone et la libération asynchrone. Ces deux modes sont liés et Syt 1 semble impliquée dans les deux voies de sécrétion.





**Figure i-31 : Deux modes de libération: synchrone et asynchrone**

**A-** Les vésicules synaptiques (SV) sont amarrées à la membrane plasmique (PM). Le complexe SNARE et Syt 1 (S) sont associés en absence de calcium (en rouge). En présence de calcium, deux mécanismes peuvent être mis en jeu : soit Syt 1 fixe les ions  $Ca^{2+}$  et induit la fermeture du complexe SNARE permettant la fusion des membranes et la libération synchrone du neurotransmetteur, soit un autre senseur calcique de forte affinité (H) lie le  $Ca^{2+}$  et se complexe avec les SNARE, provoquant la libération asynchrone.

**B-** Dans le cas des neurones KO pour Syt 1, seule la libération asynchrone peut être mise en place grâce au senseur calcique de haute affinité.

**C-** Si Syt 1 est mutée au niveau des résidus aspartates 2 et 3 du domaine C2B (D2N, D3N), elle perd sa capacité d'induire la fusion mais garde ses capacités de liaison au complexe SNARE. Ainsi, Syt 1 mutée bloque l'action du senseur calcique H et aucune fusion membranaire n'est possible.

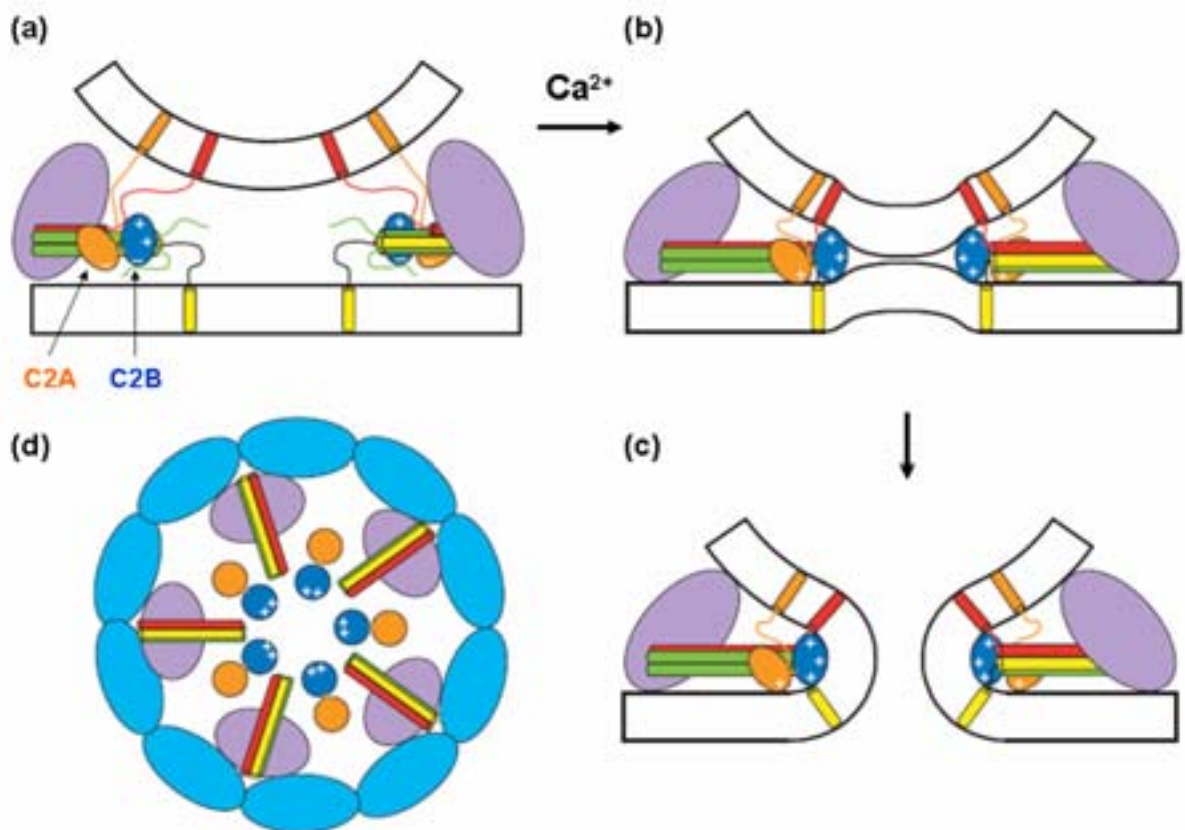
Adapté de (Nishiki and Augustine, 2004a)



## 2.1. Rôle de synchronisateur de la libération

Dans des neurones d'hippocampe de souris KO pour le gène de Syt 1, la libération rapide et synchrone des neurotransmetteurs est abolie. Néanmoins, une sécrétion lente et asynchrone est maintenue et même augmentée chez ces mutants. De plus, après un temps long suite à la stimulation (400 ms), la quantité de neurotransmetteurs libérées est identique pour des neurones de souris KO pour Syt 1 et des neurones de souris normales (Nishiki and Augustine, 2004b). Syt 1 synchronise donc la libération rapide des neurotransmetteurs après l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la partie présynaptique.

Syt 1 inhibe également la libération lente et asynchrone en absence de calcium. Une équipe propose que la fixation calcium-indépendante de Syt 1 au complexe SNARE, stabilise la machinerie de fusion. Cette stabilisation serait nécessaire pour bloquer les événements de fusion spontanée et donc pour supprimer la libération asynchrone (Yoshihara and Montana, 2004). Dans les neurones d'hippocampe de souris KO pour Syt 1, la restauration de l'expression de Syt 1 rétablit la phase de libération synchrone et réduit la phase de libération lente asynchrone des neurotransmetteurs (Nishiki and Augustine, 2004a). L'expression d'une forme mutée de Syt 1 au niveau des résidus aspartates des boucles du domaine C2B, modifie cette capacité à restaurer la libération synchrone. Ainsi, la mutation des deuxième et troisième aspartates (D2N, D3N), empêche de restaurer la libération synchrone mais ne modifie pas la capacité de réduction de la phase de libération asynchrone (figure i-31). En revanche, les mutations du premier et quatrième aspartates (D1N, D4N) ne permettent de restaurer que partiellement la capacité de libération synchrone et la capacité de réduction de la libération asynchrone (Nishiki and Augustine, 2004a). Le domaine C2B de Syt 1 régule donc les deux voies de libération des neurotransmetteurs. L'hypothèse pour expliquer ces observations pourrait venir de l'existence de deux senseurs calciques sur les vésicules, Syt 1 et un autre senseur de forte affinité (H). Le senseur H serait responsable de la libération asynchrone et la présence de Syt 1 bloquerait l'activité de ce senseur en faveur de la libération synchrone (figure i-31).



**Figure i-32 : 1<sup>er</sup> modèle d'action de Syt 1 dans la fusion membranaire**

Dans ce modèle, Syt 1 est préassemblée au complexe SNARE partiellement formé en absence de  $Ca^{2+}$  (a). Les domaines C2A (en orange) et C2B (en bleu) fixent les ions  $Ca^{2+}$  et leur potentiel de surface devient positif (b). Le fort potentiel électrostatique de surface du domaine C2B lui permet de fixer parallèlement les deux types de membranes au détriment de son association avec le complexe SNARE. Le complexe SNARE « libre » peut prendre sa conformation fermée. Le rapprochement des membranes induit par le domaine C2B et la formation du complexe SNARE tertiaire déclenchent la fusion des membranes (c). Ce modèle repose sur la coopération entre Syt 1, les SNARE et des protéines auxiliaires (en violet et en bleu) qui permettent un arrangement spatial en anneau (d). Cette organisation en anneau permet le regroupement de plusieurs domaines C2B qui apportent un potentiel électrostatique positif suffisant au rapprochement des membranes. D'autres protéines (en bleu clair) pourraient intervenir pour stabiliser cette organisation en anneau.

Adapté de (Rizo et al., 2006)

## 2.2. Rôle de déclencheur de la libération synchrone

### 2.2.1. Mise en évidence

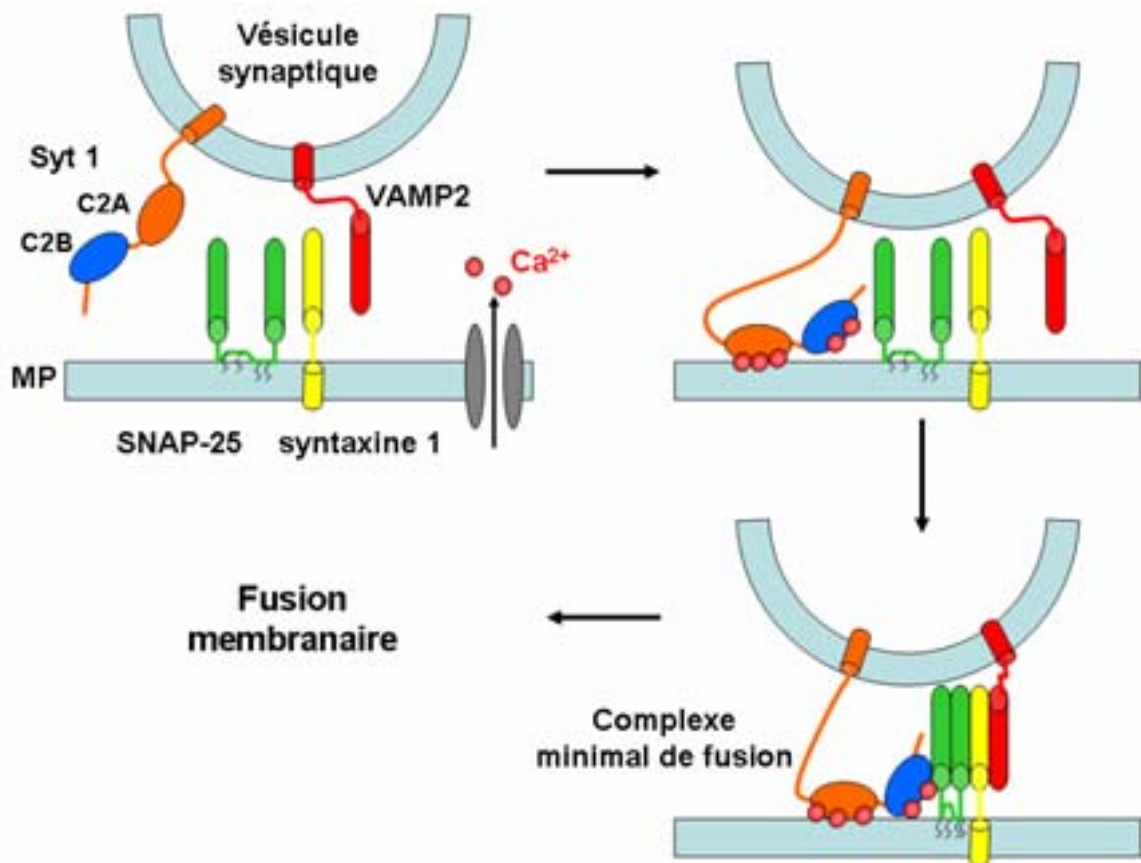
La présence de Syt 1 fonctionnelle est nécessaire pour la libération synchrone des neurotransmetteurs (Nishiki and Augustine, 2004a; Nishiki and Augustine, 2004b). Le rôle de senseur calcique de Syt 1, a été montré par l'introduction d'une mutation dans le génome d'une souris, qui réduit d'un facteur 2 l'affinité pour le calcium de Syt 1, et qui induit la même inhibition au niveau de la libération régulée par le calcium dans les synapses (Fernandez-Chacon et al., 2001). En effet, il existe une corrélation entre l'effet de la mutation sur les propriétés biochimiques de Syt 1 et l'effet sur la sécrétion. De plus, la valeur de l'affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  de Syt 1 évaluée *in vitro* en présence de phospholipides (50  $\mu\text{M}$ ) est compatible avec les valeurs de dépendance calcique de l'exocytose (Bai et al., 2002; Nalefski et al., 2001). Syt 1 est donc le senseur calcique dans la libération synchrone des neurotransmetteurs (Koh and Bellen, 2003).

D'autres études ont également montré que l'application intracellulaire d'un peptide, correspondant à la partie cytoplasmique de Syt 1, inhibe l'exocytose stimulée par le calcium au niveau de synapse géante de calamar (Bommert et al., 1993) et dans des lignées insulino-sécrétoires INS-1E ou HIT-T15 (Lang et al., 1997a) ou dans des cellules chromaffines PC12 (Earles et al., 2001). De plus, dans les cellules INS-1, l'utilisation d'une stratégie d'ARN interférence dirigée contre Syt 1 a aussi validé l'importance de Syt 1 dans l'exocytose de l'insuline (Xiong et al., 2006). Ces résultats ont permis de mettre en évidence le rôle de Syt 1 en tant que senseur calcique de l'exocytose régulée par le calcium dans différents types cellulaires.

### 2.2.2. Deux modèles d'action de Syt 1

D'après les propriétés de Syt 1, deux modèles d'action sont proposés : soit la protéine Syt 1 est un régulateur de la fusion membranaire, soit elle fait partie de la machinerie de fusion.

Le premier modèle en tant que régulateur de la fusion (figure i-32) repose sur la capacité du domaine C2B à fixer les deux membranes simultanément (Arac et al., 2006) et sur l'observation d'une interaction  $\text{Ca}^{2+}$ -indépendante de Syt 1 avec le complexe SNARE



**Figure i-33 : 2<sup>ème</sup> modèle d'action de Syt 1 dans la fusion membranaire**

Dans ce modèle, Syt 1 appartient au complexe minimal de fusion. L'entrée du calcium dans la cellule permet la fixation des ions Ca<sup>2+</sup> sur les domaines C2A (en orange) et C2B (en bleu) de Syt 1. La protéine Syt 1 se lie alors sur les phospholipides membranaires ce qui permet le rapprochement de la vésicule à la membrane plasmique et l'assemblage du complexe SNARE. Syt 1, en se liant au complexe par son domaine C2B, induit des changements conformationnels qui déclenchent la fusion des deux membranes.

(Rickman et al., 2004a; Rickman et al., 2006). Avant l'entrée du calcium dans la cellule, la synaptotagmine 1 lie le complexe SNARE préassemblé via la région polybasique de son domaine C2B. Cette interaction permet le recrutement du domaine C2B ainsi que son orientation correcte face aux membranes. L'entrée de calcium permet la fixation des ions  $\text{Ca}^{2+}$  sur les boucles des domaines C2 qui induit un changement du potentiel électrostatique de surface. Le domaine C2B réduit son interaction avec le complexe SNARE et va se fixer sur les phospholipides membranaires des deux membranes (Arac et al., 2006). La fixation simultanée du domaine C2B sur la membrane plasmique et la membrane vésiculaire permet un rapprochement des membranes. L'interaction de plusieurs domaines C2B associés en anneau, réduit drastiquement l'énergie nécessaire à la fusion des deux membranes et induit la fusion (Rizo et al., 2006; Zimmerberg et al., 2006). D'après ce modèle, Syt 1 accélère la fusion grâce au haut potentiel électrostatique de surface positif du domaine C2B. Le domaine C2A, lui ne tient qu'un rôle auxiliaire en aidant à la fixation de Syt 1 sur les phospholipides (Bowen et al., 2005; Rickman et al., 2006; Robinson et al., 2002) et en contribuant à augmenter la sensibilité globale de Syt 1 vis-à-vis du  $\text{Ca}^{2+}$  (Arac et al., 2006). Ce modèle est validé par l'observation qu'une mutation au niveau du domaine polybasique du domaine C2B, altère partiellement sa capacité à fixer simultanément les deux membranes (Arac et al., 2006), et que cette même mutation altère partiellement la libération du neurotransmetteur (Li et al., 2006). L'aspect clé de ce modèle est la coopération entre les SNARE et Syt 1 à travers une organisation structurelle appropriée. Plusieurs auteurs ont suggéré l'intervention de protéines permettant cette organisation, telle que la protéine Munc-18 mais aucune évidence directe de cette implication n'a été montrée (Dulubova et al., 1999; Misura et al., 2000).

Néanmoins, ce modèle ne prévoit pas que Syt 1 et le complexe SNARE forment la machinerie minimale de fusion  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante comme dans le second modèle proposé. En effet ce premier modèle ne permet pas d'expliquer l'augmentation de la fusion lipidique induite par les SNARE de façon  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante lors de la présence du fragment cytosolique de Syt 1 (Tucker et al., 2004). Cette observation n'explique pas non plus l'effet du domaine cytoplasmique de Syt 1 sur la fusion  $\text{Ca}^{2+}$ -indépendante (Mahal et al., 2002).

Un second modèle dans lequel Syt 1 ferait partie de la machinerie de fusion (figure i-33) se base sur les propriétés du complexe Syt / $\text{Ca}^{2+}$ /PS à modifier la conformation du complexe SNARE et à augmenter sa fusogénéicité (capacité à déclencher la fusion) (Bhalla et al., 2006; Tucker et al., 2004). Le calcium entre dans le bouton présynaptique et va se lier sur les boucles de Syt 1. La fixation du calcium provoque un changement du potentiel

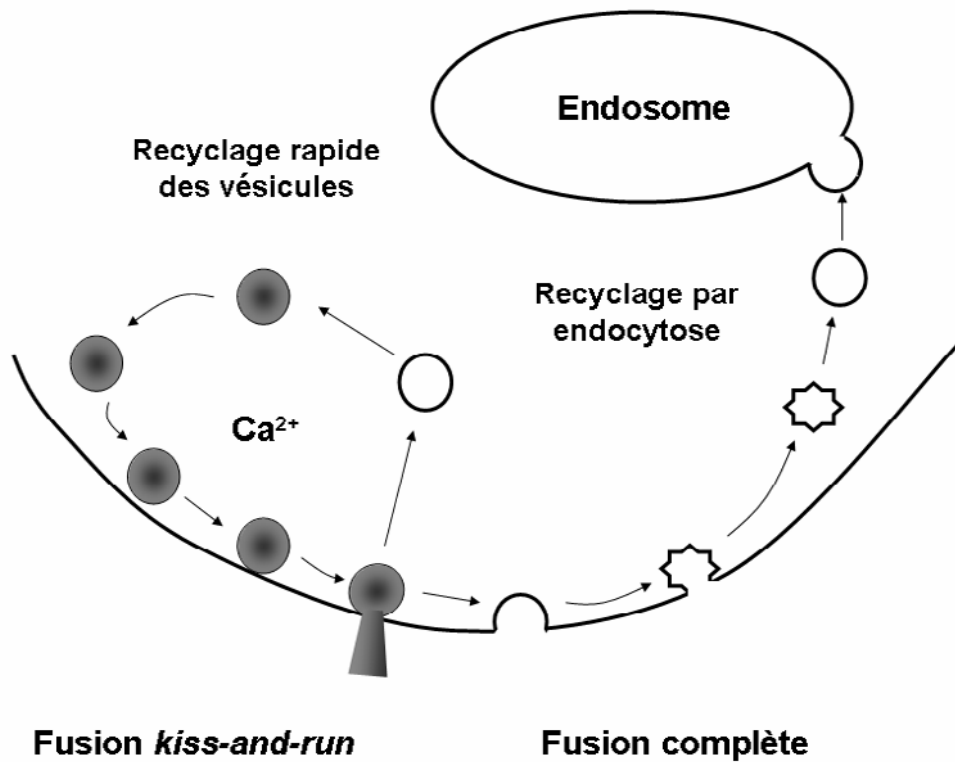
électrostatique de surface qui permet la liaison de Syt 1 sur les phospholipides (PS). Cette interaction mène à la forte adhérence des vésicules à la membrane plasmique et simultanément induit l'assemblage du complexe SNARE par le recrutement de SNAP-25. La protéine Syt 1 associée aux phospholipide (PS) et au  $\text{Ca}^{2+}$  modifierait la conformation du complexe SNARE qui déclencherait la fusion par un mécanisme encore inconnu (Zimmerberg et al., 2006). Dans ce modèle, Syt 1 et le complexe SNARE forment la machinerie minimale de fusion  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante. Néanmoins, ce modèle n'explique pas la fusion indépendante du calcium (Mahal et al., 2002), ni la fusion sans synaptotagmine (Weber et al., 1998). De plus, la légère augmentation (2-4 fois plus) de la fusion lipidique provoquée par le  $\text{Ca}^{2+}$  et le domaine cytoplasmique de Syt 1 (Tucker et al., 2004) est en contradiction avec la forte augmentation du taux de libération des neurotransmetteurs induit par l'influx calcique dans les neurones d'hippocampe (~ 18 000 fois plus) (Rhee et al., 2005).

### **3. Effet régulateur de Syt 1 sur la dynamique d'ouverture du pore de fusion**

L'exocytose implique l'ouverture d'un pore de fusion qui connecte la lumière de la vésicule de sécrétion et le milieu extracellulaire. Deux types majeurs de fusion peuvent se produire, la fusion totale ou la fusion partielle *kiss-and-run*. Des travaux ont montré l'effet régulateur du calcium sur le choix entre ces deux modes de fusion des vésicules (Ales et al., 1999).

De nombreux travaux utilisant la technique d'ampérométrie, ont mis en évidence le rôle de Syt 1 dans la dynamique d'ouverture des pores de fusion. Des mesures ampérométriques sur les PC12, ont montré que Syt 1 stabilise les pores de fusion des LDCV probablement en diminuant l'énergie libre nécessaire à la dilatation du pore de fusion (Wang et al., 2001). En effet, la perte de fonctionnalité de Syt 1 suite à des mutations des sites de liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  dans les domaines C2, réduit l'ouverture du pore de fusion (Wang et al., 2006). Cet effet pourrait venir d'un défaut de l'interaction entre Syt 1 et la machinerie de fusion. Dans les cellules PC12, l'expression de protéines Syt 1 mutées, présentant des affinités réduites pour les protéines SNARE, provoque d'importantes réductions de la stabilité du pore de fusion (Bai et al., 2004b). L'interaction de Syt 1 avec les protéines SNARE détermine donc la stabilité du pore de fusion et ainsi la dynamique de la libération. La forte affinité calcique de Syt 1 est responsable de l'effet stabilisateur sur le pore de fusion. En effet, les affinités calciques des différentes isoformes provoquent des effets différents sur la stabilité





**Figure i-34 : La régulation du mode de fusion par le calcium**

Deux modes majoritaires de fusion existent : la fusion *kiss-and-run* ou la fusion complète. Suivant l'activité synaptique qui se traduit par la concentration calcique intracellulaire, la fusion se fait selon l'un de ces modes et permet ainsi le renouvellement rapide ou lent des vésicules. Si l'activité synaptique est intense, la concentration calcique est grande ce qui induit la fusion des vésicules par le mode *kiss-and-run*. Cette fusion permet de libérer le contenu vésiculaire en gardant l'intégralité de la vésicule. Le recyclage des vésicules peut se faire rapidement car les vésicules ne passent pas par les endosomes. Par contre, si l'activité synaptique est faible, les taux de calcium sont plus bas et la fusion des vésicules est complète. Le recyclage des vésicules nécessite alors, l'endocytose par la voie dépendante de la clathrine qui passe par le compartiment endosomal.



du pore de fusion, et ainsi déterminent le choix entre les deux modes de fusion, complète ou *kiss-and-run* (figure i-34) (Wang et al., 2003a). Lors de la sécrétion des neurotransmetteurs, le mode de l'exocytose est régulé par le calcium pour permettre un couplage optimal entre l'exocytose et l'endocytose selon l'activité synaptique.

#### 4. Rôle de Syt 1 dans l'endocytose des vésicules de sécrétion

Le calcium via Syt 1 détermine le mode de fusion suivant l'activité synaptique. La fusion *kiss-and-run* permet un renouvellement rapide des vésicules synaptiques alors que la fusion complète nécessite l'endocytose des vésicules.

Chez la drosophile, la mutation d'un allèle du gène codant pour Syt 1 entraîne une diminution progressive du nombre d'événements synaptiques enregistrés au niveau d'une plaque motrice. Cependant, la transmission synaptique est maintenue (DiAntonio and Schwarz, 1994). Cette diminution est interprétée comme un défaut de recyclage des vésicules synaptiques et cette hypothèse a été confirmée par des observations sur le nématode *C. elegans* Syt 1<sup>-/-</sup> (Jorgensen et al., 1995; Littleton et al., 2001). Récemment, des mesures de capacitance sur des cellules insulino-sécrétoires INS-1, ont montré que l'extinction de Syt 1 par une stratégie d'ARN interférence entraîne la diminution de l'amplitude et de la fréquence de l'endocytose rapide (taux d'endocytose  $1/\tau > s^{-1}$ ) (Xiong et al., 2006).

Des études biochimiques ont établi que le domaine C2B de Syt 1 recrute la protéine AP2 et les PIP<sub>2</sub> de la membrane plasmique et ainsi permet la formation des puits recouverts de clathrine nécessaires à l'endocytose (Takei and Haucke, 2001; von Poser et al., 2000a; Zhang et al., 1994). Ces liaisons se font par l'intermédiaire des lysines de la région polybasique du domaine C2B (Chapman et al., 1998). L'injection intracellulaire d'un anticorps dirigé contre le domaine C2B de Syt 1 dans une synapse géante de calamar, inhibe fortement l'endocytose des vésicules synaptiques (Fukuda et al., 1995b).

Récemment, l'implication du domaine C2B de Syt 1 dans l'endocytose a été détaillée grâce à l'utilisation de différents mutants de drosophile du domaine C2B. Des mutations dans la région polybasique du domaine C2B qui correspondent aux sites de liaison à l'AP2 et aux PIP<sub>2</sub>, modifient la taille des vésicules d'endocytose mais n'affectent pas le taux d'endocytose. Cependant, Syt 1 portant les mutations du troisième et quatrième aspartate (D<sub>3,4</sub>N) du domaine C2B, altère le taux d'endocytose (Poskanzer et al., 2006). Ceci suggère que l'affinité du domaine C2B pour le calcium est nécessaire à la formation des vésicules d'endocytose.

De plus, par une approche microscopique, il a été observé que suite à une stimulation, la protéine Syt 1 endogène reste localisée en « *clusters* » sur la membrane présynaptique. Il semblerait donc que certains éléments des vésicules synaptiques restent associés à la membrane pour permettre le recyclage (Willig et al., 2006). Toutes ces études convergent vers l'idée d'un rôle de Syt 1 dans le processus d'endocytose, mais le mécanisme reste encore inconnu. Ainsi, Syt 1 pourrait réguler la dissociation du complexe SNARE par l'ATPase NSF puisqu'il se lie spécifiquement à  $\beta$ -SNAP et non à  $\alpha$ -SNAP (Schiavo et al., 1995).

### **E. La redondance fonctionnelle des Syt**

Une quinzaine d'isoformes de Syt ont été identifiées chez les vertébrés (Craxton, 2004b) et la question suivante a vite émergé : pourquoi autant d'isoformes distinctes ? La fonction de toutes les isoformes n'est pas connue mais certaines partagent la même fonction de senseur calcique.

Une des possibilités serait que certaines Syt, malgré un rôle commun de senseur calcique, présentent des divergences d'affinité au calcium afin de détecter les différentes variations de la concentration calcique intracellulaire ( $[Ca^{2+}]_i$ ) (Bhalla et al., 2005; Sudhof, 2002). Ainsi, différents types cellulaires ou même différents organelles d'une même cellule, pourraient fusionner avec les membranes cibles à différentes concentrations de calcium intracellulaire. En effet, Syt 1, Syt 7 et Syt 9 ont des  $EC_{50}$  très distincts (Bhalla et al., 2005). Par exemple, l' $EC_{50}$  de Syt 7 (0,3  $\mu$ M) est approximativement 400 fois plus bas que celui de Syt 1 (116  $\mu$ M), alors que la courbe de fusion dose-réponse au calcium de Syt 9 présente deux points d'inflexion à 0,40 et 32  $\mu$ M. Certaines Syt possèderaient ainsi des différences dans leur capacité à déclencher la fusion des membranes en fonction de la concentration calcique.

De même, ces différences d'affinité pour le  $Ca^{2+}$ , concorderaient avec l'hypothèse selon laquelle plusieurs senseurs calciques interviendraient lors des étapes de *tethering*, *docking* et *priming* qui sont calcium-dépendantes, et lors de l'étape de fusion déclenchée par le calcium. En effet, il existe plusieurs pools de vésicules prêtes à fusionner, HCSP et RRP et chacun des pools pourrait posséder son propre senseur calcique (Nagy et al., 2006). Cette hypothèse est envisageable dans la sécrétion de l'insuline puisque plusieurs isoformes sont exprimées dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques et la lignée insulino-sécrétoire INS-1 (Barg and Rorsman, 2004).

La présence de plusieurs isoformes dans une cellule permet d'envisager une complémentarité fonctionnelle. En effet, les cellules neuroendocrines PC12 n'exprimant plus Syt 1, ne présentent cependant aucun défaut apparent dans la sécrétion stimulée par du calcium sur une longue période lors de mesures biochimiques à faible résolution temporelle (Shoji-Kasai et al., 1992). Ce phénomène peut être expliqué par le fait que Syt 9 est fortement exprimée dans les PC12, et que cette isoforme est étroitement liée à Syt 1. Syt 1 et Syt 9 seraient donc, fonctionnellement redondantes dans les cellules neuroendocriniennes (Fukuda et al., 2002a; Tucker et al., 2003). Ces observations ne sont pas retrouvées dans les neurones où l'absence de Syt 1 altère profondément la sécrétion.

Par analogie aux neurones, il est aussi possible d'envisager que la protéine Syt 1 est essentielle pour la sécrétion rapide et synchrone mais pas pour la sécrétion lente et asynchrone, et que Syt 9 soit le senseur calcique de la libération asynchrone dans les PC12. De ce fait, la perte de Syt 1 n'aurait pas d'effet apparent sur la quantité totale d'exocytose régulée par le calcium, car elle serait compensée par une augmentation continue de l'exocytose lente (Voets et al., 2001). Néanmoins, l'existence de deux types de libération, synchrone et asynchrone dans les cellules neuroendocrines ou endocrines, n'a jamais été mise en évidence.

## **F. La synaptotagmine 9**

Syt 1 est l'isoforme la plus étudiée et comme nous l'avons vu précédemment, cette isoforme est impliquée dans de nombreuses étapes de la sécrétion régulée des neurotransmetteurs dans les neurones. D'autres isoformes existent et certaines présentent des propriétés biochimiques différentes de Syt 1 ce qui suggère des rôles distincts de ces isoformes lors du trafic membranaire. Certaines isoformes, en revanche, sont très proches du point de vue de la séquence protéique de Syt 1 et pourraient ainsi exercer les mêmes fonctions. C'est le cas de Syt 9 qui présente une forte homologie de séquence à Syt 1 (identiques à 72 % et similaires à 86%) (Rickman et al., 2004b). De plus, les études de localisation cellulaire et fonctionnelles de Syt 9 ont permis d'envisager Syt 9 comme le senseur calcique de la sécrétion régulée de l'insuline dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques.

Il faut noter qu'une confusion a eu lieu dans la nomenclature de Syt 5 et de Syt 9, lors du clonage de Syt 9. En effet, la séquence codant pour cette nouvelle isoforme a été clonée pour la première fois à partir d'ADNc d'humain et de rat et a été nommée Syt 5 (Craxton and Goedert, 1995; Hudson and Birnbaum, 1995). L'erreur de nomenclature a été poursuivie et la

forme Syt 9 de souris a aussi été nommée Syt 5 (Fukuda et al., 1999). Ainsi, les ADNc de Syt 9 de souris et de rat sont appelés Syt 5.

## 1. Expression tissulaire et localisation cellulaire

La protéine Syt 9 a été initialement découverte au niveau du cerveau (Craxton and Goedert, 1995). Cette isoforme présente une expression différente selon les tissus. En effet, chez le rat, Syt 9 présente de faibles taux d'expression dans certains tissus non neuronaux tels que le tissu adipeux, le rein, le cœur et les poumons (Hudson and Birnbaum, 1995). Depuis, Syt 9 a été retrouvée dans un autre tissu non neuronal, au niveau du pancréas endocrine dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques (Iezzi et al., 2005a; Iezzi et al., 2004).

La localisation de Syt 9 dans les neurones a été suggérée comme étant sur les vésicules synaptiques (Hudson and Birnbaum, 1995). Dans les PC12, les cellules  $\beta$  et les lignées dérivées, Syt 9 est une protéine vésiculaire fortement localisée sur les LCDV (Iezzi et al., 2005a; Iezzi et al., 2004; Shin et al., 2004), mais se trouve également au niveau des SLMV dans les cellules dérivées des cellules  $\beta$  (Monterrat, et al., en révision).

## 2. Propriétés biochimiques spécifiques des domaines C2 de Syt 9

Plusieurs études ont montré une fixation calcium-dépendante du domaine cytoplasmique de Syt 9 sur des liposomes contenant des phospholipides anioniques (PS) comparable à celle du domaine cytoplasmique de Syt 1 (Rickman et al., 2004b; Shin et al., 2004; Tucker et al., 2003). Bien qu'il y ait une grande ressemblance entre les domaines C2 de Syt 9 et de Syt 1 (69 % d'identité pour C2A et 81 % pour C2B), les domaines C2 de Syt 9 présentent certaines particularités.

Le domaine C2A de Syt 9 se lie aux phospholipides anioniques (25 % PS/75 % PC) de manière dépendante du calcium. L'affinité du domaine C2A pour le calcium est légèrement plus haute ( $\sim 6 \mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ ) que celle du domaine C2A de Syt 1 ( $\sim 10 \mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ ). La fixation aux liposomes a également été testée en présence de  $\text{Sr}^{2+}$ . Le  $\text{Sr}^{2+}$  est capable de stimuler l'exocytose comme le  $\text{Ca}^{2+}$  (Shin et al., 2003), et il présente une très haute affinité apparente pour le domaine C2A de Syt 9 ( $\sim 100 \mu\text{M}$  de  $\text{Sr}^{2+}$ ) en comparaison au domaine C2A de Syt 1 ( $>3 \text{ mM}$  de  $\text{Sr}^{2+}$ ).

A la grande différence de Syt 1, le domaine C2B de Syt 9 ne se fixe pas aux phospholipides de façon  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante ou indépendante et ce, même en présence de  $\text{Sr}^{2+}$  (Shin et al., 2004). L'incapacité du domaine C2B à former des complexes  $\text{Ca}^{2+}$ /phospholipides est due à une séquence, en acides aminés, contenant la boucle 3 et les 6<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> feuillettes  $\beta$  du domaine C2B. Le remplacement de cette séquence (316-344 acides aminés de Syt 1) dans le domaine C2B de Syt 9 permet de restaurer la capacité de liaison aux phospholipides de manière calcium dépendante (Shin et al., 2004).

Les interactions de Syt 9 aux protéines SNARE ont également été étudiées en comparaison aux liaisons calcium-dépendantes et indépendantes de Syt 1 au complexe SNARE, détaillées précédemment. Suivant les auteurs et les techniques utilisées, les conclusions sur la capacité de Syt 9 à lier les protéines SNARE divergent. Certaines études ont montré une interaction *in vitro* entre Syt 9 recombinante et les protéines t-SNARE, la syntaxine 1 et SNAP-25 (Fukuda et al., 2002a; Tucker et al., 2003; Zhang et al., 2002). Cependant, l'immunoprécipitation du complexe SNARE à partir d'extraits de cerveau de rat, montre que Syt 9 ne co-précipite pas avec les protéines SNARE contrairement à Syt 1 et à la complexine qui sont fortement enrichies dans les extraits immunoprécipités (Bhalla et al., 2005; Shin et al., 2004). Ainsi, Shin et coll. suggèrent que *in vivo* Syt 9 ne lie pas le complexe SNARE bien que *in vitro* (par pull-down) cette interaction soit possible. Néanmoins, il est possible que la fixation de Syt 9 au complexe SNARE soit trop fugace ou que la quantité de protéines soit limitée pour permettre la détection de la liaison par des immunoprécipitations (Bhalla et al., 2005). Dans ce cas, cette interaction doit présenter une affinité plus faible de celle de Syt 1, qui lie étroitement le complexe SNARE en présence et en absence de  $\text{Ca}^{2+}$ . Pourtant d'après l'étude des interactions *in vitro*, la fixation de Syt 9 recombinante au complexe SNARE est plus forte que celle observée pour Syt 1 (Bhalla et al., 2005; Rickman et al., 2004b; Tucker et al., 2003). Une autre hypothèse permettant d'expliquer ces différences observées *in vitro* et *in vivo*, serait que la fixation  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante de Syt 9 au complexe SNARE soit un artéfact du pull-down, ce qui a été déjà observé avec les Syt (Sugita and Sudhof, 2000).

Malgré les divergences de résultats concernant la liaison de Syt 9 au complexe SNARE, de récentes études ont montré la capacité de Syt 9 à stimuler *in vitro* la fusion de liposomes induite par le complexe SNARE de façon dépendante du calcium (Bhalla et al., 2005). Syt 9 possède donc les caractéristiques biochimiques nécessaires pour tenir le rôle de senseur calcique de la fusion membranaire.

### **3. Rôles physiologiques de Syt 9 dans les cellules $\beta$ et dans d'autres types cellulaires**

Syt 9 est une isoforme exprimée dans plusieurs types cellulaires tels que les neurones, les cellules endocrines  $\beta$  primaires et les cellules neuroendocriniennes. Cette protéine est également retrouvée dans les lignées cellulaires dérivant des cellules  $\beta$  primaires. L'étude fonctionnelle de Syt 9 dans les lignées cellulaires est difficile puisque dans ces cellules, Syt 1 et Syt 2 sont également exprimées et localisées au niveau des vésicules LDCV et SLMV, où elles tiennent le rôle de senseurs calciques de l'exocytose régulée (Lang et al., 1997a). Cependant, ces isoformes ne sont pas exprimées dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques primaires (Jacobsson et al., 1994) et seule l'isoforme Syt 9 est localisée sur les granules sécrétoires contenant l'insuline, suggérant un rôle de senseur calcique de Syt 9 dans ces cellules.

Ainsi, dans les lignées insulino-sécrétoires, Syt 9 pourrait être le senseur calcique de la libération de l'insuline. Dans la lignée INS-1E, l'inhibition de l'expression de Syt 9, entraîne la diminution de la sécrétion régulée par le glucose. Dans des cellules n'exprimant plus de Syt 9, la sécrétion induite par le PMA (ester de phorbol) n'est pas modifiée (Iezzi et al., 2004). Le PMA stimule la PKC qui potentialise l'exocytose de l'insuline sans passer par une élévation de la concentration calcique intracellulaire (Regazzi et al., 1989). Un des effets des kinases, PKC et PKA est d'augmenter principalement la taille du pool de vésicules relargables HCSP par des mécanismes distincts de ceux empruntés par le glucose (Yang and Gillis, 2004). L'effet inhibiteur, sur la sécrétion stimulée par le glucose, de l'absence de Syt 9 est donc spécifique de l'exocytose  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante.

L'effet de l'inhibition de l'expression de Syt 9 a aussi été étudié dans les îlots de Langerhans (Iezzi et al., 2005a) en utilisant un adénovirus exprimant le siRNA dirigé contre l'ARNm de Syt 9. La stimulation de l'exocytose de ces îlots par du tolbutamide, qui est un inhibiteur des canaux potassiques ATP-dépendants, provoque une forte réduction de la sécrétion d'insuline ce qui suggère que Syt 9 est le senseur calcique de l'étape finale de l'exocytose. Cependant, la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose est totalement restaurée en présence de forskoline et d'IBMX, qui stimulent la production d'AMPc et donc la PKA. Ainsi, Syt 9 ne semble pas uniquement jouer le rôle de senseur calcique de l'exocytose et pourrait intervenir dans des étapes plus précoces lors de l'exocytose des granules d'insuline.

La fonction de Syt 9 a été étudiée dans un autre type de cellules endocrines, les cellules chromaffines PC12. Ces cellules expriment les isoformes Syt 1 et Syt 9, qui sont toutes les deux localisées sur les LDCV. L'injection d'un anticorps dirigé contre le domaine C2A de Syt 9 inhibe la sécrétion de norépinéphrine (NE) de 20 % dans ces cellules. Des résultats similaires sont obtenus avec un anticorps dirigé contre le domaine C2A de Syt 1 (Fukuda et al., 2002a). De plus, dans ce type cellulaire, l'injection intracellulaire des parties cytosoliques C2AB ou des domaines isolés C2B de Syt 9 ou de Syt 1, inhibe la libération des catécholamines (Tucker et al., 2003). Ces résultats sont contradictoires avec ceux trouvés par Shin et coll., qui ne voient pas de diminution de la sécrétion du contenu des LDCV. Ces auteurs proposent que Syt 9 ne soit pas un senseur calcique mais un modulateur de la sécrétion, dépendant du  $Ca^{2+}$  (Shin et al., 2004). Plus récemment, une stratégie d'ARN interférence de Syt 1 et 9 ont montré l'implication de Syt 9 dans la sécrétion régulée dans les lignées PC12 (Fukuda, 2004).

Dans les cellules PC12, Syt 9 serait donc un senseur calcique de l'exocytose des LDCV et Syt 1 serait impliquée dans le processus d'exocytose par des interactions  $Ca^{2+}$ -dépendantes avec Syt 9 via les domaines C2 (Fukuda, 2004).

Dans le cerveau, la localisation sous-cellulaire précise de syt 9 et sa fonction sont encore inconnues. Une étude a suivi l'évolution de l'expression de Syt 9 et de Syt 1 lors du développement post-natal du cerveau de souris (Fukuda, 2006) afin de mieux définir le rôle de Syt 9 dans le cerveau. Ainsi, les isoformes Syt 1 et Syt 9 sont exprimées dans les mêmes régions du cerveau, c'est-à-dire essentiellement au niveau du bulbe olfactif, de l'hippocampe et du cortex cérébral. Par contre, les deux isoformes sont localisées sur des vésicules différentes. Syt 1 co-localise avec la synaptophysine au niveau des vésicules synaptiques contenant les neurotransmetteurs, alors que Syt 9 est retrouvée sur les vésicules à cœur dense. Ces résultats sont très différents de ceux discutés précédemment où les deux isoformes Syt 1 et Syt 9 étaient localisées sur les mêmes vésicules dans la lignée PC12 (Fukuda, 2004; Fukuda et al., 2002a). De plus, l'expression de Syt 9 dans le cerveau durant le développement postnatal ne varie pas alors que l'expression de Syt 1 augmente (Fukuda, 2006). Ces observations suggèrent que Syt 9 n'interviendrait pas dans la sécrétion des neurotransmetteurs.

Un rôle de Syt 9 a également été mis en évidence dans d'autres cellules sécrétoires. Dans des cellules RBL (*Rat Basophilic Leukemia*), une lignée clonale proche des mastocytes, Syt 9 aurait une fonction de régulation du transport entre le compartiment de recyclage ERC (*endocytic recycling compartment*) et la membrane plasmique (Haberman et al., 2003; Haberman et al., 2005). En effet, l'inhibition de l'expression de Syt 9 a pour effet d'inhiber le trafic vésiculaire entre ERC et la membrane plasmique mais pas l'internalisation de la transferrine vers les endosomes précoces. Syt 9 n'interviendrait donc pas au niveau de l'endocytose mais dans les étapes plus tardives du recyclage vésiculaire. Sa fonction pourrait intervenir au niveau de la liaison entre les vésicules sortant du ERC et le réseau de microtubules car Syt 9 interagit avec la tubuline *in vivo* et *in vitro*.

Dans les différents types cellulaires étudiés, Syt 9 tient des fonctions distinctes dans les mécanismes de trafic vésiculaire. Dans les cellules endocrines et neuroendocrines, Syt 9 est impliquée dans la sécrétion régulée, et dans d'autres cellules sécrétoires dérivée des mastocytes, elle régule le recyclage des vésicules.



## **OBJECTIFS DE L'ETUDE**



Ce travail avait pour but d'étudier et de caractériser le senseur calcique de l'exocytose de l'insuline dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques.

Dans les cellules primaires  $\beta$ -pancréatiques, trois isoformes de synaptotagmines, Syt 7, Syt 8 et Syt 9, étaient des candidats potentiels pour tenir ce rôle (Gao et al., 2000; Gut et al., 2001).

En effet, l'introduction des protéines recombinantes Syt 7 et Syt 8 dans des cellules perméabilisées d'îlots de rat, réduit considérablement la sécrétion de l'insuline (Gut et al., 2001). Ainsi ces protéines pourraient réguler l'exocytose de l'hormone. Dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques, l'expression de ces deux isoformes a été vérifiée par Northern-blot mais aucune localisation sub-cellulaire n'a été établie pour Syt 8. Cette protéine a été localisée uniquement au niveau des spermatozoïdes où elle régulerait la réaction acrosomique dépendante du calcium (Hutt et al., 2005). Concernant la protéine Syt 7, plusieurs expériences ont montré l'effet de la surexpression de cette protéine sur la sécrétion régulée dans les cellules endocrines et neuroendocrines (Gao et al., 2000; Wang et al., 2005). La localisation de Syt 7 varie selon le type cellulaire étudié et selon la nature, endogène ou surexprimée, de la protéine. Une localisation de la protéine endogène a été réalisée dans les cellules  $\beta$  où elle colocalise avec l'insuline. Cependant, cette co-localisation a été réalisée à basse résolution ce qui ne permet pas d'identifier avec certitude la nature des vésicules. Lorsque la protéine Syt 7 est surexprimée dans les cellules endocrines et neuroendocrines, la protéine est retrouvée au niveau des LDCV et des lysosomes (Wang et al., 2005), de la membrane plasmique (Sugita et al., 2001) ou du TGN (Fukuda et al., 2002c). Par contre, dans les cellules non sécrétrices, Syt 7 endogène est localisée au niveau des endosomes et des lysosomes où elle régule la fusion calcium-dépendante des lysosomes avec la membrane plasmique (Czibener et al., 2006). D'après les différentes localisations de Syt 7 dans les lignées cellulaires, il est probable que Syt 7 endogène ait une localisation distincte de la forme surexprimée et qu'elle ne soit pas localisée sur les granules de sécrétion dans les cellules endocrines.

La protéine Syt 9 quant à elle, est localisée sur les LDCV dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques primaires et dans les lignées dérivées (Iezzi et al., 2004). Elle a été impliquée dans la sécrétion de l'insuline dans ces cellules (Iezzi et al., 2005a). Cependant, les études biochimiques concernant les interactions de Syt 9 avec les phospholipides et avec les protéines SNARE montrent un comportement distinct de Syt 9 vis-à-vis des membranes par rapport à Syt 1. De plus, dans d'autres cellules sécrétoires dérivées des mastocytes, Syt 9 est localisée au niveau des endosomes et serait impliquée dans les mécanismes de recyclage des

vésicules (Haberman et al., 2003; Haberman et al., 2005). Si Syt 9 se comporte différemment de Syt 1, possède-t-elle comme Syt 1 les propriétés nécessaires au rôle de senseur calcique de l'exocytose régulée par le calcium ?

L'objectif de ce travail a été dans un premier temps, de déterminer parmi les trois isoformes Syt 7, Syt 8 et Syt 9, celle(s) qui jouai(en)t le rôle de senseur calcique de l'étape finale de l'exocytose de l'insuline.

Nous avons ainsi généré des anticorps contre les isoformes et étudié la localisation des isoformes endogènes Syt 7 et Syt 8 dans les lignées insulino-sécrétoires.

Dans un second temps, nous avons étudié les caractéristiques *in vitro* et *in vivo* de liaison aux membranes de Syt 9 en absence ou en présence de calcium. Ainsi, nous déterminerons la dépendance calcique de la liaison de Syt 9 à la membrane plasmique et son implication dans la sécrétion de l'insuline. Pour cela nous avons comparé les propriétés de Syt 9 à celles de Syt 2 qui est un des senseurs calciques de la neurosécrétion. Par une approche de mutagenèse dirigée des domaines C2 de Syt 9, nous avons déterminé le rôle de chaque domaine dans les interactions aux membranes.

Parallèlement, nous avons initié une étude de la fonction de Syt 9 dans le trafic vésiculaire des granules de sécrétion en utilisant une approche d'inhibition de l'expression de cette protéine dans les cellules  $\beta$ . Ainsi, nous pourrons observer son rôle éventuel dans les étapes précoces de l'exocytose.

## **RÉSULTATS-PARTIE I**

*The calcium-sensing protein synaptotagmin 7 is expressed on different endosomal compartments but not on large dense core vesicles in pancreatic  $\beta$ -cells and in neurons*

*Carole Monerrat, Florence Grise, Agnès Hémar and Jochen Lang*

en révision au près du journal *Histochemistry and Cell Biology*



## Introduction

La libération de l'insuline par les cellules  $\beta$ -pancréatiques s'effectue par un mécanisme d'exocytose régulée par le calcium. Les mécanismes moléculaires liant l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire à la fusion membranaire ne sont pas complètement décrits (Rizo et al., 2006). Cependant, les synaptotagmines (Syt) sont des protéines impliquées dans la régulation de la fusion membranaire lors du transport vésiculaire et l'isoforme Syt 7 pourrait jouer un rôle dans la sécrétion de cette hormone.

D'une part, Syt 7 a été localisée sur les granules d'insuline dans des îlots  $\beta$ -pancréatiques de rat et les cellules clonales RINm5F (Gao et al., 2000). D'autre part, la surexpression de Syt 7 dans la lignée cellulaire RINm5F augmente significativement la sécrétion d'insuline (Gao et al., 2000) et les peptides recombinants sont capables d'inhiber la libération du contenu des LDCV dans les cellules perméabilisées HIT-T15 et les cellules d'îlots pancréatiques (Gut et al., 2001). Syt 7 présente aussi une affinité pour les phospholipides en présence de calcium de l'ordre du  $\mu\text{M}$ , valeur compatible avec celle atteinte lors de l'exocytose. Cette isoforme a donc été proposée comme un senseur calcique potentiel de l'exocytose de l'insuline.

Dans une lignée stable de cellules endocrines PC12, l'isoforme Syt 7 se retrouve au niveau du réseau *trans* golgien et des LDCV (Fukuda et al., 2004; Fukuda et al., 2002c; Wang et al., 2005). Comme dans les cellules HIT-T15 et les cellules  $\beta$ , l'application de peptides Syt 7 recombinants inhibe la sécrétion des LDCV dans les PC12 (Tucker et al., 2003).

D'une manière plus générale, l'isoforme Syt 7 pourrait donc être le senseur calcique de la sécrétion des LDCV dans les cellules endocrines, comme les cellules PC12 et les cellules  $\beta$ .

Cependant, dans d'autres types cellulaires, cette isoforme présente des localisations sous-cellulaires distinctes. Dans les fibroblastes et les macrophages, Syt 7 est localisée au niveau des lysosomes. Dans ces cellules, l'utilisation d'anticorps dirigés contre cette isoforme ou la surexpression d'une forme mutée inhibe fortement la fusion des lysosomes avec la membrane plasmique (Czibener et al., 2006; Martinez et al., 2000; Reddy et al., 2001). Dans les neurones, Syt 7 semble aussi être impliquée dans l'exocytose des lysosomes (Arantes and Andrews, 2006). De plus, plusieurs variants d'épissage sont exprimés dans les neurones et certains de ces variants réguleraient le recyclage des vésicules synaptiques (Virmani et al.,

2003a). Syt 7 jouerait alors un rôle dans l'exocytose des lysosomes et dans le recyclage des vésicules synaptiques dans les neurones.

La localisation de la protéine Syt 7 endogène varie en fonction des différents types cellulaires. De plus, l'isoforme surexprimée présente des localisations différentes de celle de la protéine endogène. De ce fait, la localisation précise de Syt 7 est nécessaire pour déterminer sa fonction. Nous avons donc étudié la distribution sous-cellulaire de Syt 7 endogène dans des cellules sécrétoires telles que les cellules  $\beta$  endocrines, les cellules chromaffines PC12 et les neurones. Ainsi, suivant la localisation de Syt 7 dans les cellules insulino-sécrétoires, nous pourrions mieux définir l'implication de cette isoforme dans la sécrétion d'insuline.



The calcium-sensing protein synaptotagmin 7 is expressed on different endosomal compartments but not on large dense core vesicles in pancreatic  $\beta$ -cells and in neurons

*Carole Monerrat, Florence Grise, Agnès Hémar and Jochen Lang*

*C. Monerrat, F. Grise, J. Lang*

*Institut Européen de Chimie et Biologie, Pôle Biologie Cellulaire et*

*Moléculaire, JE 2390, 33607 Pessac/Bordeaux, France*

*A. Hémar*

*UMR 5091 CNRS/Physiologie Cellulaire de la Synapse, Université Bordeaux 2,*

*Bordeaux/France*

Corresponding author: J. Lang

[j.lang@iecb.u-bordeaux.fr](mailto:j.lang@iecb.u-bordeaux.fr); phone 0033 540 00 33 49; fax 0033 540 00 33 48

Running title:

Localisation of synaptotagmin 7 in endocrine cells

## **Abstract**

Synaptotagmin (syt) isoforms function as calcium sensor in post-Golgi transport although the precise transport step and compartment(s) concerned are still not fully resolved. As syt7 has been proposed to operate in lysosomal exocytosis and in exocytosis of large dense core vesicles (LDCVs), we have addressed the distribution of endogenous syt7 in insulin-secreting cells. These cells express different syt7 isoforms comparable to neurons. According to subcellular fractionation and quantitative immunocytochemistry, syt7 is not found on LDCVs, synaptic-like microvesicles or lysosomes but colocalizes with Rab7 on early endosomes and to structures near to or at the plasma membrane. Similarly, endogenous syt7 was absent from LDCVs in pheochromocytoma PC12 cells. In contrast, syt7 localised to lysosomes in both, PC12 cells and hippocampal neurons. In conclusion, endogenous syt7 shows a particular distribution in endocrine  $\beta$ -cells and does not qualify as vesicular calcium sensor in SLMV or LDCV exocytosis according to its localisation.

Keywords: exocytosis, endocytosis, synaptotagmin, pancreatic  $\beta$ -cells, hippocampal neurons

## Introduction

Synaptotagmins form a family of transmembrane proteins containing C2 domains and are implicated in the regulation of membrane fusion in vesicular transport through interaction with SNARE proteins and membrane lipids. The most studied synaptotagmins (syt), syt1 and 2, bind phospholipids and SNARE proteins in a calcium-dependant fashion via the C<sub>2</sub>-domains and thereby attach to lipid membranes and protein complexes involved in exocytosis (Jahn et al., 2003). Moreover, genetic, electrophysiological and biochemical evidences have established their role as a calcium-sensor in membrane fusion during exocytosis (Brunger, 2006; Jahn et al., 2003). The 16 synaptotagmins currently known can be classified according to their biochemical properties and by sequence alignment (Craxton, 2004a). Calcium-dependant phospholipid binding has been reported for syt1, 2, 3, 5, 7 and 9 (Rickman et al., 2004b) and these isoforms have been implicated in the regulation of membrane fusion in different models.

Several isoforms have been localised on defined subcellular compartments suggesting their implication in defined transport steps. Whereas syt1, 2, 5 and 9 are found on synaptic vesicles and/or large dense core vesicles (Fukuda et al., 2002a; Geppert et al., 1991; Lang et al., 1997a), syt3 and 6 are present on plasma membranes or adjacent structures (Butz et al., 1999; Gut et al., 2001), syt4 resides in proximity of the trans-Golgi network (Berton et al., 2000; Butz et al., 1999; Gut et al., 2001; Ibata et al., 2000) and syt8 on post-Golgi vesicles (Montserrat et al., 2006). Different and sometimes controversial subcellular localisations have been reported for syt7 such as plasma membrane in neurons or lysosomes in fibroblasts (Martinez et al., 2000; Sugita et al., 2001). Moreover, syt7 was found on large dense core vesicles upon overexpression in neuroendocrine and endocrine cells and regulating exocytosis (Fukuda et al., 2004; Gao et al., 2000; Wang et al., 2005). In addition, recombinant C2 domains of syt7 inhibit the exocytosis of insulin (Gut et al., 2001). However, the latter observation may reflect affinity for syt effectors but not the function of the endogenous protein.

In view of the close relationship between exo- and endocytotic pathways (Rorsman and Renstrom, 2003; Sudhof, 2004), precise subcellular localisation of the endogenous protein has to be determined to draw conclusions from functional assays. Moreover, overexpression may alter the localisation of a given protein. We were therefore interested to investigate the subcellular distribution in secretory cells such as the endocrine insulin-secreting  $\beta$ -cells,

neuroendocrine PC12 cells and in hippocampal neurons. Our data demonstrate that syt 7 targets to distinct endosomal compartments depending on the cell type investigated but is not present on large dense core vesicles.

## Material and Methods

### Material

The following commercial monoclonal antibodies were employed: anti-Vti1b C17, (Transduction Laboratories, Erembodegem, Belgium); anti-calreticulin and anti-syntaxin 6 (Stressgen; Victoria, BC, Canada); anti-insulin K36, anti- $\beta$ COP, anti-golgi 58K and anti-synaptophysin/SVP38 (Sigma, Lyon, France). Anti-syt7 (Sysy, Goettingen, Germany) is directed against a GST fusion protein (amino acids 46 to 133) containing the connecting sequence of the smallest nontruncated splice variant. Several antibodies were kindly donated: Anti-Ti VAMP C158.2 (Dr. T. Galli, Paris), monoclonal anti-ICA (Dr Michele Solimena, Dresden), anti-SV2C (Dr Richard Janz, Houston), anti-N-terminal syt7 (Dr Norma Andrews), anti-LAMP1 and anti-CgA (Dr. Marie Luisa Malosio, Milano). HRP-linked anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies were purchased from Amersham Biosciences (Saclay, France), Alexa-labelled secondary antibodies were obtained from Molecular Probes (Leiden, Netherlands). A plasmid encoding peGFP-rab7 was kindly provided by B. van Deurs (Panum Institute, Copenhagen) and peGFP-CD63 by G. Griffiths (Cambridge University).

### Cell culture and fluorescence microscopy

MIN6, PC12 and INS1-E cells were cultured and transfected as published (Lajus et al., 2006; Monterrat et al., 2006). PC12 were generously provided by Dr Brian Rudkin (ENS, Lyon, France) and cultured in DMEM supplemented with 7% foetal bovine serum and 7% horse serum. Primary hippocampal neurons were prepared from rat embryos as described previously (Monterrat et al., 2006). Imaging was performed on a LMS 510 Meta confocal laser microscope (Zeiss) (Monterrat et al., 2006). Stacks separated by 0.5  $\mu$ m were acquired using sequential acquisition for each channel. For quantification, stacks were thresholded from 6 to 8 cells and colocalisation of pixels and intensities determined with Metamorph (Universal Imaging). The means determined for each cell were taken as single value. Values are given as mean +/- SEM.

### Post-nuclear supernatants and subcellular fractionation

Cells were washed twice with PBS pH 7.4 (without  $Mg^{2+}$ ), detached by incubation with 10 mM EDTA-PBS for 5 min at 37° C and centrifuged at 800g for 5 min at 4° C. Pelleted cells were resuspended in PBS and sonicated for 2 min on ice. Brain extracts were prepared as published (Monterrat et al., 2006). Post-nuclear supernatants (PNS) were obtained by a 10

min centrifugation of cells or brain homogenates at 1000g and at 4°C. Subcellular fractionation by velocity sedimentation on sucrose gradient was performed as described (Lang et al., 1997a; Monterrat et al., 2006; Zhang et al., 1998a). Total protein contents were measured by Bradford assay (Biorad, Marnes-la-Coquette France). SDS-PAGE, immunoblots, visualisation and quantification was performed as published (Boal et al., 2004b; Monterrat et al., 2006).

## Results

Several splice variants of *syt7* have been described giving rise to differentially expressed small or large isoforms of the protein (Fukuda et al., 2002b; Sugita et al., 2001). We first compared the expression of synaptotagmin 7 proteins in insulin secreting cells and PC12 cells to brain homogenates. As Shown in Fig. 1, different molecular weight forms were evident by immunoblotting migrating either between 40 and 50 or between 60 and 70 kDa. The most prominent 42 kDa form was found in all preparations used whereas the high molecular weight forms were below detection limits or absent in PC12 cells in accordance with previous reports (Sugita et al., 2001; Wang et al., 2005).

To gain insight into the subcellular distribution of the various forms we performed a subcellular fractionation of INS1-E cells on a continuous sucrose gradient. We have employed here a rather shallow gradient to optimize the separation of light compartments, such as synaptic-like microvesicles (SLMVs), and more dense organelles. As given in Fig. 2 (A and B), the SLMV marker protein SVP38/synaptophysin was present in early fractions with a peak at fractions 2 and 3, whereas the LDCVs markers insulin or Islet cell Autoantigen 512 (ICA) peaked at fraction 11. Between these markers for SLMNVs and LDCVs we found ER-Golgi transport vesicles ( $\beta$ -COP) and a widely distributing endoplasmic reticulum (calreticulin). We have used a number of other markers to further describe the distribution of organelles. The synaptic vesicle proteins SV2A and SV2B comigrated with SVP, whereas SV2C distributed with more dense organelles but clearly distinct from LDCVs. The endosomal SNARE Ti-VAMP migrated similar to SLMVs whereas the Golgi/post-Golgi SNARE Vti1b was separated from the SLMV markers. The protein complexin 1/2, a cytosolic component recruited to plasma membrane SNARE complexes, was found in the soluble fractions (fraction 1) as well as in fraction 6 and 7, which probably contained the plasma membrane. The SNARE protein synaptotagmin 9 was evident in early fractions, comigrating with SLMV markers, and peaked again in late fractions containing markers for LDCVs. On close inspection at high magnification, the intermediate fractions 6 to 9 contained a doublet and the lower band may represent non-glycosylated *syt9* from the ER. The large forms of *syt7* (60 to 70 kDa) distributed together mainly in fraction 2 to 4, thus slightly distinct from Ti-VAMP. The small forms of *syt7* migrated similarly but in addition peaked again at fraction 8. We did not find any *syt7* at higher fractions indicative of presence on LDCVs. Comparable results were obtained on fractionation of insulin-secreting MIN6 cells by a continuous sucrose

gradient, i.e. migration at early (light) fractions and again a peak at higher density distinct from LDCVs (data not shown).

We subsequently employed confocal laser microscopy to further investigate and quantify the subcellular distribution of synaptotagmin 7 (Fig. 3). In clonal INS1-E  $\beta$ -cells Syt7 was present on intracellular organelles and near or at the plasma membrane (Fig. 3A, arrow). Among the endosomal markers used, only LAMP distributed to a small extent with syt7. CD63-eGFP, a marker for multivesicular bodies, or the transferrin receptor did not demonstrate any significant codistribution. Moreover, syt7 did not colocalize with Ti-VAMP in INS1-E, HIT-T15 or primary  $\beta$ -cells (data not shown). In contrast, transiently expressed Rab7-eGFP colocalised to a high degree with syt7, especially if staining for syt7 near the plasma membrane was not taken into account (see arrow). A similar distribution of syt7 and LAMP or Rab7-eGFP was also found in HIT-T15, MIN6 or primary  $\beta$ -cells (data not shown). These data indicate that syt7 is present in insulin-secreting cells mainly on early endosomes and only to a minor extent on lysosomes.

We next asked whether endogenous syt7 may colocalize with classical exocytotic vesicles as shown for overexpressed syt7 in PC-12 cells (Fukuda et al., 2004; Gao et al., 2000; Wang et al., 2005). In INS1-E cells syt7 did clearly not colocalise with LDCV markers such as chromogranin A (CgA) or insulin (Fig. 3B). Similarly, syt7 stained structures different from those detected by syntaxin 6, a marker of the Trans Golgi network and immature granules (Kuliawat et al., 2004a). In contrast, some colocalisation was evident for syt9. This may reflect localisation on similar endocytotic compartments during recycling. Again, the absence of staining for syt7 on LDCVs was also evident in MIN6 cells where in addition also an antibody against the N-terminal luminal domain was used (data not shown).

As the presence of syt7 on Ti-VAMP and LAMP positive compartments has been observed in several cell types, we also investigated the neuroendocrine PC12 cells. As shown in Fig. 3C, a substantial degree of colocalisation was evident in these cells for both markers. Similar to endocrine cells, syt7 immunoreactivity did not overlap with CgA suggesting that endogenous syt7 is not expressed on LDCVs.

PC12 and pancreatic  $\beta$ -cells share many features with neurons in terms of expression of specific proteins and we determined whether the distribution of syt7 is comparable or not to endocrine or neuroendocrine cells. In hippocampal neurons syt7 is present in a granular distribution mainly in the cell body and we never observed any clear outlining of the plasma membrane. As observed in PC12 and insulin secreting cells, syt7 did not colocalize with the



transferrin receptor. In contrast, a high degree of costaining was observed for syt7 and the lysosomal marker LAMP as well as Ti-VAMP. We also employed costaining for MAP to distinguish between dendrites and axons. As shown in Fig. 4, syt7 is found on somato-dendritic structures and, in addition, was present in a number of synaptophysin-positive elements indicating its expression at synapses.

## Discussion

Synaptotagmin isoforms function as calcium sensor in post-Golgi transport although the precise transport step and compartment(s) concerned are still not fully resolved. Insulin-secreting cells provide a useful model as their physiology is well characterized and the distribution of several other isoforms has been elucidated (Gut et al., 2001; Iezzi, 2004; Lang et al., 1997a; Monterrat et al., 2006). Moreover they express a considerable amount of syt7 as shown here, which offers a certain advantage in comparison to PC12 cells. The expression pattern in terms of small and large syt7 was comparable to those observed in brain extracts here and reported previously (Sugita et al., 2001).

The lysosomal expression of syt7 has clearly been established in a large number of cell lines mainly of endothelial origin as well as its role in the fusion of this organelle with the plasma membrane (Andrew and Chakrabartia, 2005). As shown here, endocrine cells such as pancreatic  $\beta$ -cells clearly differ from neuroendocrine cells and primary hippocampal neurons as syt7 is mainly expressed on earlier endocytic compartments. It should, however, be pointed out that mainly the long splice variants were examined previously and at least overexpression of a short form in rat kidney cells results in a considerable degree of localisation at early endosomes (Martinez et al., 2000). As the short splice variants constitute the major isoforms in PC12 and in clonal  $\beta$ -cells, the differential localisation is rather due to differences in the cellular organisation than to the presence of distinct splice variants.

In addition to its localisation in the endosomal/lysosomal pathway we also observed the presence of syt7 nearby or at the plasma membrane in insulin-secreting cells. This observation is in line with biochemical and ultrastructural data from neurons (Sugita et al., 2001; Virmani et al., 2003b) and also explains its presence on synaptophysin stained structures, i. e. synapses, observed here. The precise subcellular localisation is unclear but does not include synaptic vesicles (Sugita et al., 2001). Interestingly, the short splice variant of syt7 is directed to clathrin-coated pits and may regulate the pit assembly (von Poser et al., 2000b).

Our data on the distribution of endogenous synaptotagmin 7 in endocrine and neuroendocrine cells suggest a role for this isoform in endocytotic traffic but do not support a role in exocytosis of large dense core vesicles or synaptic-like microvesicles. Indeed, syt7 did not colocalize with secretory insulin granules in subcellular gradients in contrast to the isoforms syt9. It should be pointed out that we used a rather shallow gradient for better resolution. This allowed also separating markers for secretory granules from SV2C which has previously been claimed to be expressed on granules (Iezzi et al., 2005b). The absence of syt7

from secretory granules is also suggested by the phenotype of *syt7* knock-out mice which have a normal life span (Chakrabarti et al., 2003). A previous report on *syt7* expression on secretory granules in  $\beta$ -cells was based on low resolution imaging without quantification (Gao et al., 2000). Another class of exocytotic vesicles is represented by SLMVs carrying synaptophysin. They are known to harbour the isoforms *syt1*, 2 and 9 as demonstrated here and reported previously (Iezzi, 2004; Lang et al., 1997a). Again, we did not observe any colocalisation for synaptic-like microvesicles in line with the reported absence of *syt7* from synaptic vesicles (Sugita et al., 2001).

In conclusion, our data demonstrate that *syt7* has a wider distribution within the endocytic/lysosomal pathway and its precise localisation may be cell-type dependent. Moreover, the absence of endogenous *syt7* from large dense core vesicles questions its physiological role in the exocytosis of secretory granules although it may be important during subsequent endocytosis.

## **Acknowledgements**

We thank Marie-Noëlle Benassy for excellent technical assistance. This work was supported by grants from the Region of Aquitaine and the University of Bordeaux I (BQR2004/5).

## Reference List

- Andrew NW, Chakrabarti S (2005) There's more to life than neurotransmission: the regulation of exocytosis by synaptotagmin VII. *Trends Cell Biol* 15:626-631
- Berton F, Cornet V, Iborra C, Garrido J, Dargent B, Fukuda M, Seagar M, Marqueze B (2000) Synaptotagmin I and IV define distinct populations of neuronal transport vesicles. *Eur J Neurosci* 12:1294-1302
- Boal F, Zhang H, Tessier C, Scotti PA, Lang J (2004) The variable C-terminus of cysteine string proteins modulates exocytosis and protein-protein interactions. *Biochemistry* 43:16212-16223
- Brunger AT (2006) Structure and function of SNARE and SNARE-interacting proteins. *Q Rev Biophys* 38:1-47
- Butz S, Fernandez-Chacon R, Schmitz F, Jahn R, Sudhof TC (1999) The subcellular localizations of atypical synaptotagmins III and VI. Synaptotagmin III is enriched in synapses and synaptic plasma membranes but not in synaptic vesicles. *J Biol Chem* 274:18290-18296
- Chakrabarti S, Kobayashi KS, Flavell RA, Marks CB, Miyake K, Liston DR, Fowler KT, Gorelick FS, Andrews NW (2003) Impaired membrane resealing and autoimmune myositis in synaptotagmin VII-deficient mice. *J Cell Biol* 162:543-549
- Craxton M (2004) Synaptotagmin gene content of the sequenced genomes. *BMC Genomics* 5:43
- Fukuda M, Kowalchuk JA, Zhang X, Martin TF, Mikoshiba K (2002) Synaptotagmin IX regulates  $Ca^{2+}$ -dependent secretion in PC12 cells. *J Biol Chem* 277:4601-4604
- Fukuda M, Ogata Y, Saegusa C, Kanno E, Mikoshiba K (2002) Alternative splicing isoforms of synaptotagmin VII in the mouse, rat and human. *Biochem J* 365:173-180.
- Fukuda M, Kanno E, Satoh M, Saegusa C, Yamamoto A (2004) Synaptotagmin VII is targeted to dense-core vesicles and regulates their  $Ca^{2+}$ -dependent exocytosis in PC12 cells. *J Biol Chem* 279:52677-52684
- Gao Z, Reavey-Cantwell J, Young RA, Jegier P, Wolf BA (2000) Synaptotagmin III/VII isoforms mediate  $Ca^{2+}$ -induced insulin secretion in pancreatic islet  $\beta$ -cells. *J Biol Chem* 275:36079-36085
- Geppert M, Archer BT, 3rd, Sudhof TC (1991) Synaptotagmin II. A novel differentially distributed form of synaptotagmin. *J Biol Chem* 266:13548-13552
- Gut A, Kiraly CE, Fukuda M, Mikoshiba K, Wollheim CB, Lang J (2001) Expression and localisation of synaptotagmin isoforms in endocrine beta-cells: their function in insulin exocytosis. *J Cell Sci* 114:1709-1716
- Ibata K, Fukuda M, Hamada T, Kabayama H, Mikoshiba K (2000) Synaptotagmin IV is present at the Golgi and distal parts of neurites. *J Neurochem* 74:518-526
- Iezzi M, Theander S, Janz R, Loze C, Wollheim CB (2005) SV2A and SV2C are not vesicular  $Ca^{2+}$  transporters but control glucose-evoked granule recruitment. *J Cell Sci* 118:5647-5660

- Iezzi M, Kouri, G., Fukuda, M., Wollheim C.B. (2004) Synaptotagmin V and IX isoforms control  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent insulin exocytosis. *J. Cell Sci.* 117:3119-3127
- Jahn R, Lang T, Südhof TC (2003) Membrane fusion. *Cell* 112:519-533
- Kuliawat R, Kalinina E, Bock J, Fricker L, McGraw TE, Kim SR, Zhong J, Scheller R, Arvan P (2004) Syntaxin-6 SNARE involvement in secretory and endocytic pathways of cultured pancreatic  $\beta$ -cells. *Mol. Biol. Cell* 15:1690-1701
- Lajus S, Vacher P, Huber D, Dubois M, Benassy MN, Ushkaryov Y, Lang J (2006) Alpha-latrotoxin induces exocytosis by inhibition of voltage-dependent  $\text{K}^+$  channels and by stimulation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels via latrophilin in  $\beta$ -cells. *J Biol Chem* 281:5522-5531
- Lang J, Fukuda M, Zhang H, Mikoshiba K, Wollheim CB (1997) The first C2 domain of synaptotagmin is required for exocytosis of insulin from pancreatic  $\beta$  -cells: action of synaptotagmin at low micromolar calcium. *EMBO J* 16:5837-5846
- Martinez I, Chakrabarti S, Hellevik T, Morehead J, Fowler K, Andrews NW (2000) Synaptotagmin VII regulates  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent exocytosis of lysosomes in fibroblasts. *J Cell Biol* 148:1141-1149
- Montserrat C, Boal F, Grise F, Hemar A, Lang J (2006) Synaptotagmin 8 is expressed both as a calcium-insensitive soluble and membrane protein in neurons, neuroendocrine and endocrine cells. *Biochim Biophys Acta* 1763:73-81
- Rickman C, Craxton M, Osborne S, Davletov B (2004) Comparative analysis of tandem C2 domains from the mammalian synaptotagmin family. *Biochem J* 378:681-686
- Rorsman P, Renstrom E (2003) Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46:1029-1045
- Südhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27:509-547
- Sugita S, Han W, Butz S, Liu X, Fernandez-Chacon R, Lao Y, Südhof TC (2001) Synaptotagmin VII as a plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  sensor in exocytosis. *Neuron* 30:459-473
- Virmani T, Han W, Liu X, Südhof TC, Kavalali ET (2003) Synaptotagmin 7 splice variants differentially regulate synaptic vesicle recycling. *EMBO J.* 22:5347-5357
- von Poser C, Zhang JZ, Mineo C, Ding W, Ying Y, Südhof TC, Anderson RGW (2000) Synaptotagmin Regulation of Coated Pit Assembly. *J. Biol. Chem.* 275:30916-30924
- Wang P, Chicka MC, Bhalla A, Richards DA, Chapman ER (2005) Synaptotagmin VII is targeted to secretory organelles in PC12 cells, where it functions as a high-affinity calcium sensor. *Mol Cell Biol* 25:8693-8702
- Zhang H, Kelley WL, Chamberlain LH, Burgoyne RD, Wollheim CB, Lang J (1998) Cysteine-string proteins regulate exocytosis of insulin independent from transmembrane ion fluxes. *FEBS Lett* 437:267-272

## Figure Legends

**Fig. 1** Expression of synaptotagmin 7 isoforms in insulin secreting cells. Homogenates (40 µg) of indicated cell lines or tissues (rat or mouse brain, mouse islets) were separated by SDS-PAGE and immunoblotted (anti-Syt7, 1:6000). Molecular weights (in kDa) are given.

**Fig. 2** Subcellular fractionation of INS1-E clonal β-cells. Postnuclear supernatants were fractionated on a continuous sucrose gradient and fractions analyzed. A: distribution of density, total protein and immunoreactive insulin. B: Distribution of marker proteins (synaptophysin/SVP38, βCOP, calreticulin and ICA), intensities are given as determined from immunoblots. C: Immunoblots of SV2 isoforms, vesicular SNAREs Vti1b and Ti-VAMP, of complexin 1/2, synaptotagmin 9 and 7. Molecular weights for SYT7 are indicated by horizontal bars (70, 60, 50 and 40 kDa).

**Fig. 3** Confocal microscopy of synaptotagmin 7 immunoreactivity in INS1-E clonal β-cells and PC12 pheochromocytoma cells. The following markers were used: transiently expressed Rab7-eGFP or CD63-eGFP; LAMP; SVP38, synaptophysin; Tf-R, transferring receptor; INS, insulin; CgA, chromogranin A; SYT9, synaptotagmin 9; SYX 6, syntaxin 4. The statistics of pixel distributions are given below. In the case of rab7-eGFP distribution of the central compartment (central) was also determined separately. Bars equal 10 µm.

**Fig 4** Distribution of synaptotagmin 7 in hippocampal neurons. The distribution of synaptotagmin 7, TfR, LAMP, Ti-VAMP, MAP and SVP is given. Bars equal 10 µm.

Figure 1

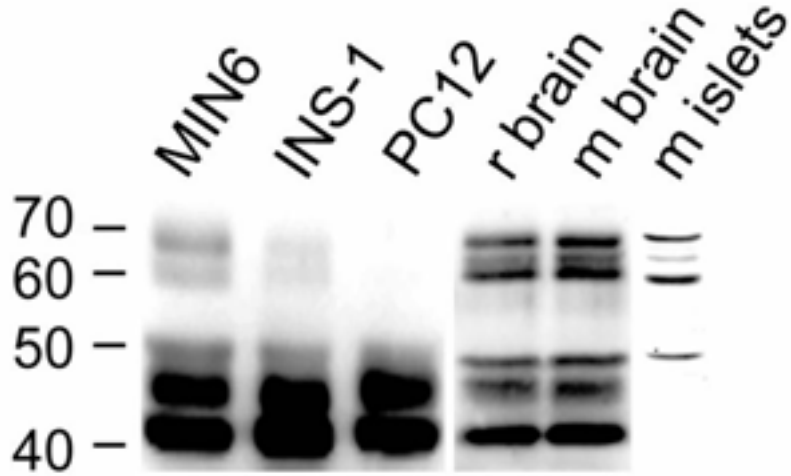




Figure 2

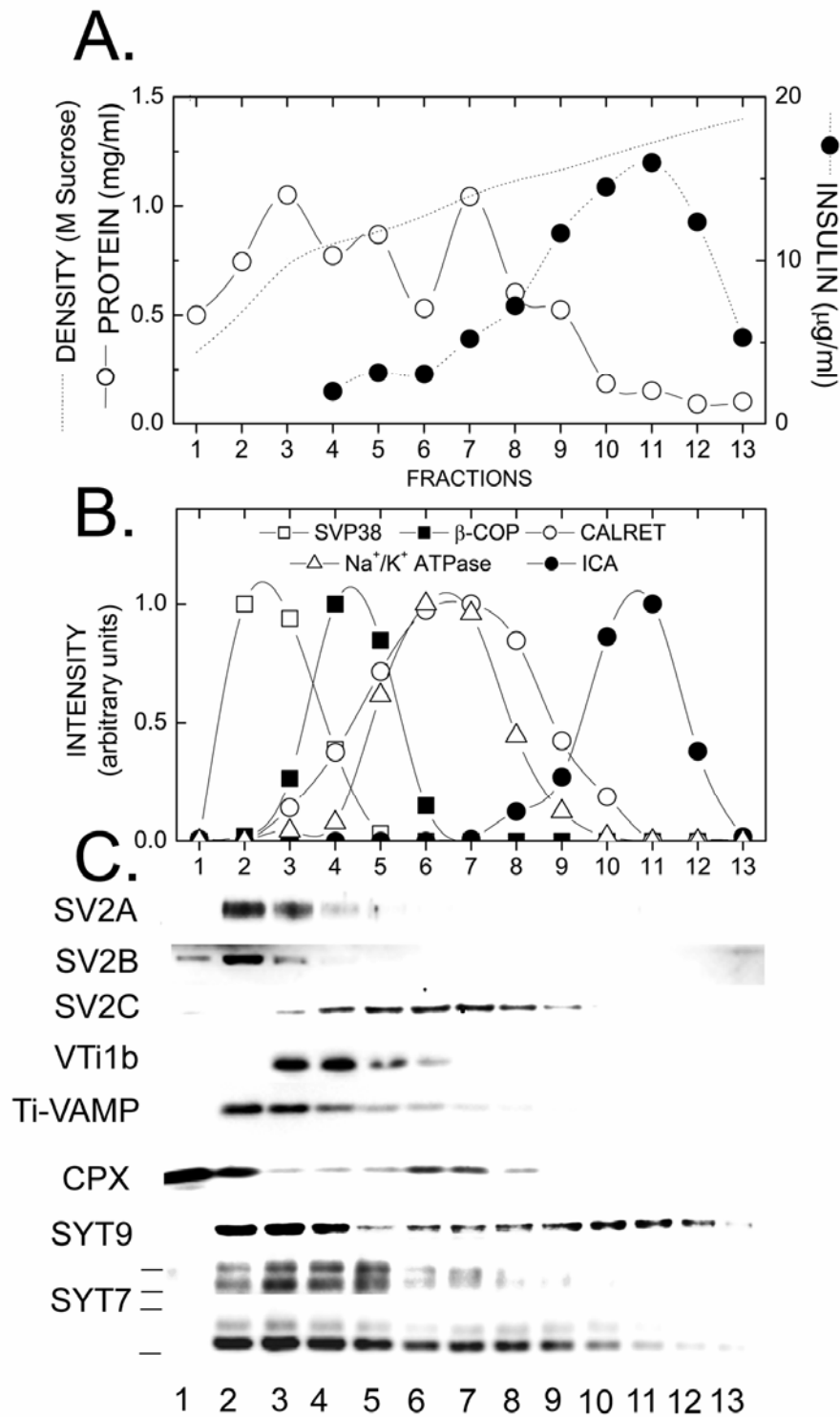


Figure 3

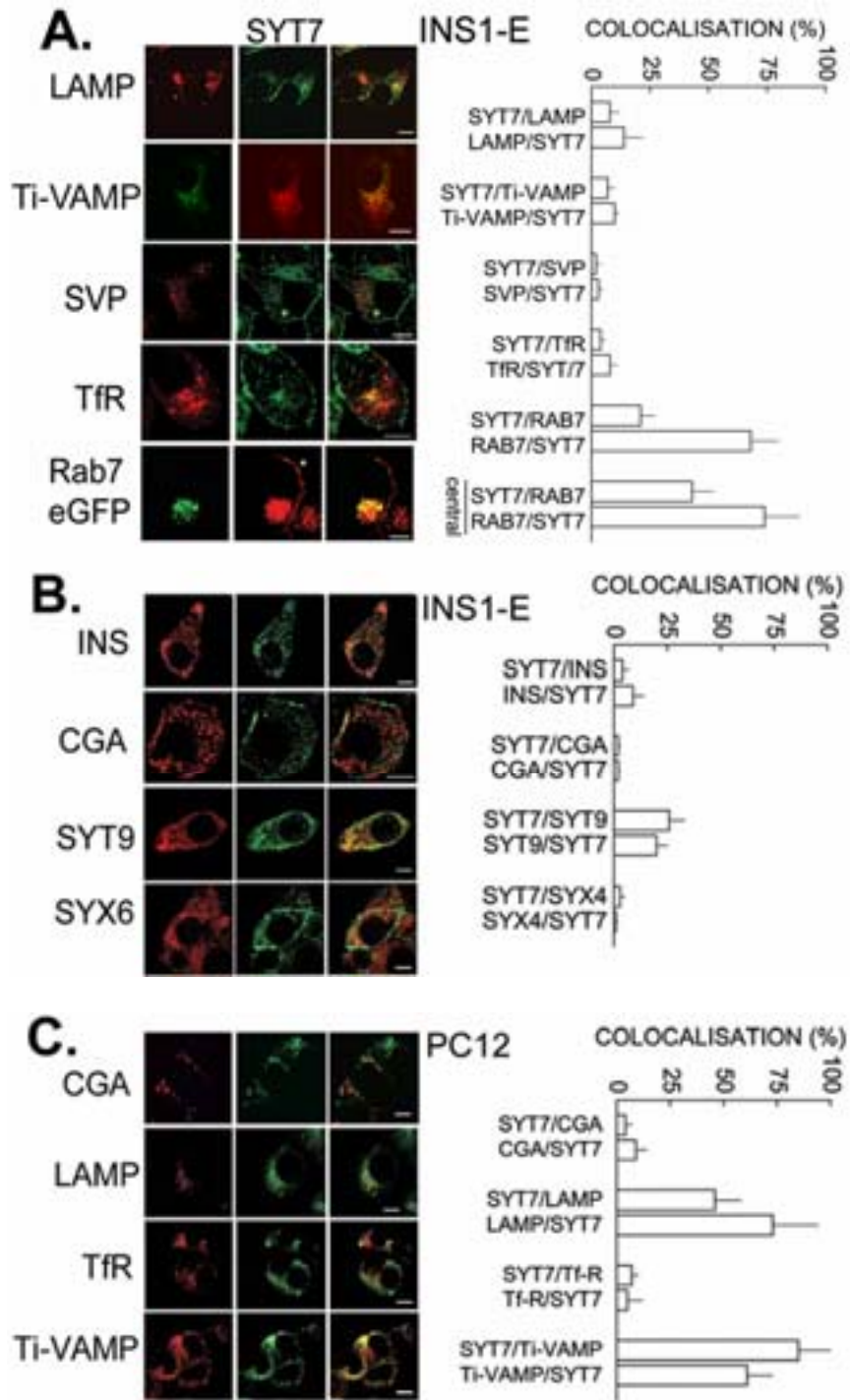
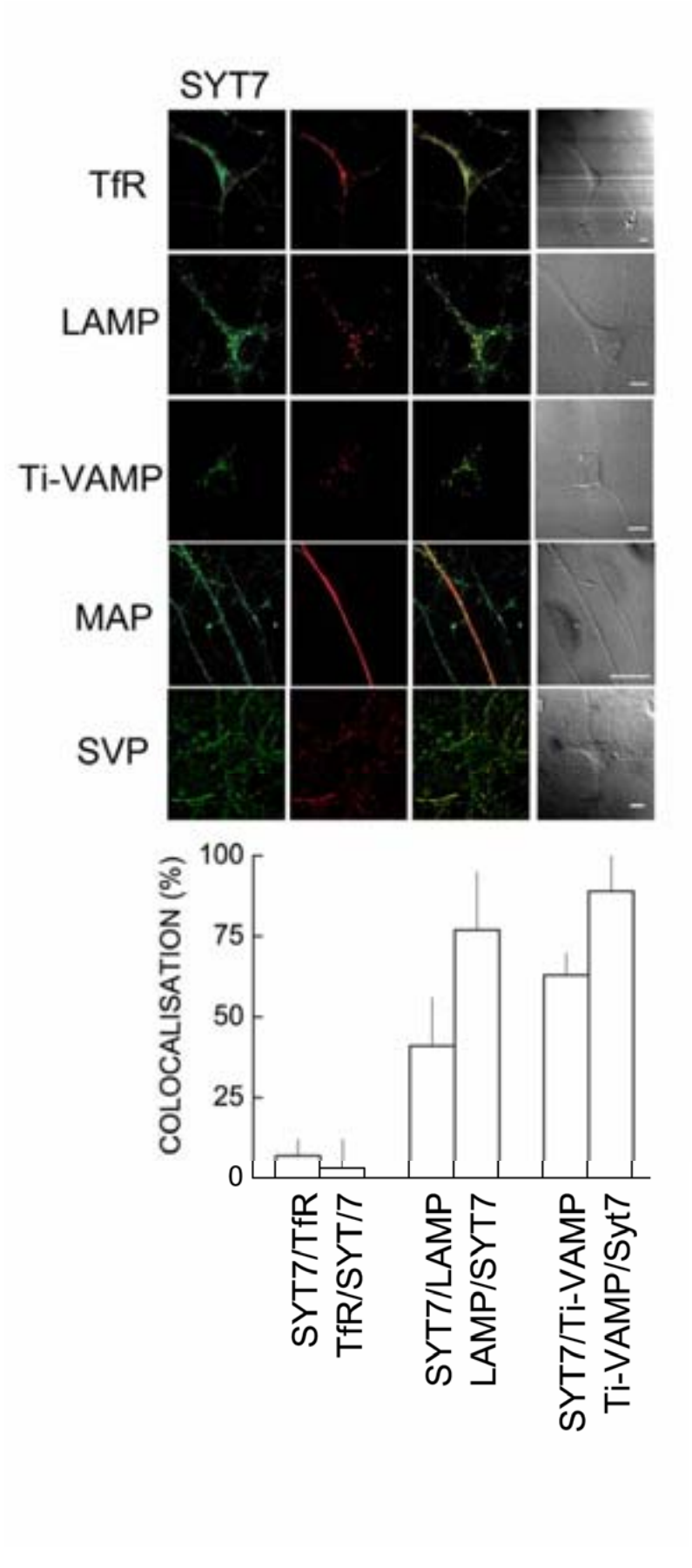


Figure 4



## Discussion

De nombreuses synaptotagmines sont impliquées dans la régulation de la fusion membranaire dans les étapes de transport vésiculaire post-golgien en tant que senseurs calciques. La synaptotagmine 7 a été impliquée dans les mécanismes d'exocytose des lysosomes dans les neurones et dans les macrophages, et des granules de sécrétion dans les cellules chromaffines PC12 et les cellules insulino-sécrétoires.

Lors de cette étude, nous avons cherché à déterminer la localisation sous-cellulaire de Syt 7 dans différentes cellules sécrétoires. Plusieurs variants d'épissage de Syt 7 sont exprimés dans les cellules endocrines et le cerveau. Les variants d'épissage de haut poids moléculaire (60-70 kDa) sont exprimés essentiellement au niveau du cerveau et donc la localisation de Syt 7 sur les vésicules synaptiques dans les neurones pourrait correspondre à ces variants. La forme majoritaire de 42 kDa, est retrouvée dans toutes les lignées insulino-sécrétoires, les cellules  $\beta$ -pancréatiques, les cellules neuroendocrines et les neurones. Suivant le type cellulaire, la localisation de Syt 7 varie entre le compartiment lysosomal dans les neurones et les cellules PC12, et le compartiment endosomal dans les cellules sécrétant l'insuline. Dans la mesure où le variant de 42 kDa est majoritaire dans toutes les lignées, cette différence de localisation ne semble pas être due à l'expression différentielle des variants de Syt 7. La différence de localisation entre les PC12 et les cellules insulino-sécrétoires vient peut-être d'une différence dans l'organisation des cellules. Une étude a aussi montré que le variant court de Syt 7 (forme de 42 kDa) était retrouvé au niveau des puits recouverts de clathrine et qu'il était impliqué dans la régulation de l'assemblage des puits d'endocytose (von Poser et al., 2000a). Ces données suggèrent un rôle de Syt 7 dans la voie d'endocytose. Ces observations sont en accord avec la localisation de Syt 7 dans les endosomes dans les cellules insulino-sécrétoires. Nous avons également retrouvé Syt 7 au niveau de la membrane plasmique ou sur des structures proches de la membrane plasmique dans les cellules insulino-sécrétoires. Cependant, aucune localisation au niveau des granules de sécrétion n'est retrouvée dans ces cellules et dans les cellules PC12, ce qui suggère que Syt 7 endogène ne joue pas de rôle dans l'exocytose régulée des granules de sécrétion d'insuline ou des SLMV.

Ce manuscrit est en cours de révision pour le journal *Histochemistry and Cell Biology*. Une meilleure caractérisation de l'anticorps est demandée. Cet anticorps commercial (Synaptic System, Goetting, Germany) a déjà été utilisé dans une publication qui a permis de localiser Syt 7 (Sugita et al., 2001). En vue d'apporter ces précisions, nous venons de tester la spécificité de l'anticorps en réalisant des contrôles de préabsorption de l'anticorps sur le

peptide Syt 7 (acides aminés 46-133 de Syt 7 chez le rat) qui a servi à produire l'anticorps. Suite à l'incubation de l'anticorps Syt 7 avec le peptide, aucune bande n'est détectée dans les homogénats de INS-1E, MIN6, HIT-T15 et de cerveau de rat par l'anticorps. Les bandes observées correspondent bien à des variants d'épissage de Syt 7. De même, nous sommes en train d'identifier par RT-PCR les variants d'épissage retrouvés dans les cellules insulino-sécrétoires de rat (INS-1E) et ceux exprimés dans le cerveau de rat. Nos résultats, encore préliminaires, indiquent une bonne corrélation entre les formes détectées par immunoblot et celles identifiées par RT-PCR.



## RESULTATS-PARTIE II

*Synaptotagmin 8 is expressed both as a calcium-insensitive soluble and membrane protein in neurons, neuroendocrine and endocrine cells*

*Carole Monerrat, Frédéric Boal, Florence Grise, Agnès Hémar and Jochen Lang (2006). Biochim Biophys Acta **1763**, 73-81.*





## Introduction

La protéine Syt 8 est une isoforme de Syt non conventionnelle. Elle ne possède pas tous les résidus aspartates nécessaires à la coordination des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et pourtant la protéine recombinante conserve la capacité de s'associer aux protéines SNARE (Rickman et al., 2004a) et de lier les inositol 1,3,4,5-tétrakisphosphates (Ibata et al., 1998).

Dans les spermatozoïdes, Syt 8 est localisée sur l'acrosome où elle est responsable de la fusion membranaire de l'acrosome en réponse à une élévation de la concentration calcique intracellulaire (Hutt et al., 2005; Hutt et al., 2002). De plus, Syt 8 est capable de lier la protéine SNARE syntaxine 1 de manière dépendante du calcium avec une affinité calcique comparable à celle de la réaction acrosomiale, ce qui suggère que Syt 8 est un senseur calcique (Hutt et al., 2005).

Dans les lignées insulino-sécrétoires et les cellules  $\beta$ -pancréatiques, l'ARNm de Syt 8 est présent et l'application du domaine C2AB recombinant sur des cellules perméabilisées d'îlot pancréatique, inhibe l'exocytose d'insuline régulée par le calcium (Gut et al., 2001). Syt 8 pourrait donc être impliquée dans l'exocytose des granules d'insuline.

L'expression de multiples variants d'épissage confère une grande variété de fonction et de localisation des isoformes (Craxton, 2004b; Fukuda and Mikoshiba, 1999). De ce fait, la localisation précise des synaptotagmines endogènes est nécessaire pour déterminer la fonction des isoformes. Or aucune localisation de Syt 8 endogène sur les granules de sécrétion n'a été recherchée pour confirmer l'implication de Syt 8 dans la sécrétion d'insuline.

Afin de caractériser la localisation sous cellulaire de Syt 8 dans les lignées insulino-sécrétoires, les cellules neuroendocrines (PC12) et les neurones, nous avons généré et caractérisé un anticorps spécifique dirigé contre l'extrémité C-terminale de Syt 8. Ainsi, nous pourrions étudier la localisation de cette isoforme et ainsi vérifier si cette protéine pourrait être impliquée dans la libération de l'insuline par les cellules insulino-sécrétoires.

# Synaptotagmin 8 is expressed both as a calcium-insensitive soluble and membrane protein in neurons, neuroendocrine and endocrine cells

Carole Monterrat<sup>a</sup>, Frédéric Boal<sup>a</sup>, Florence Grise<sup>a</sup>, Agnès Hémar<sup>b</sup>, Jochen Lang<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institut Européen de Chimie et Biologie, Pôle Biologie Cellulaire et Moléculaire, JE 2390, 33607 Pessac/Bordeaux, France

<sup>b</sup> UMR 5091 CNRS/Physiologie Cellulaire de la Synapse, Université Bordeaux 2, Bordeaux/France

Received 11 June 2005; received in revised form 12 November 2005; accepted 14 November 2005

Available online 13 December 2005

## Abstract

Synaptotagmins (syt) form a large family of transmembrane proteins and some of its isoforms are known to regulate calcium-induced membrane fusion during vesicular traffic. In view of the reported implication of the isoform syt8 in exocytosis we investigated the expression, localisation and calcium-sensitivity of syt8 in secretory cells. An immunopurified antipeptide antibody was generated which is directed against a C-terminal sequence and devoid of crossreactivity towards syt1 to 12. Subcellular fractionation and immunocytochemistry revealed two forms of synaptotagmin 8 (50 and 40 kDa). Whereas the 40-kDa was present in the cytosol in brain, in PC12 and in clonal  $\beta$ -cells, the 50-kDa form was localised in very typical clusters and partially colocalised with the SNARE protein Vti1a. Moreover, in primary hippocampal neurons syt8 was only found within the soma. Amplification of syt8 by RT-PCR indicated that the observed protein variants were not generated by alternative splicing of the 6th exon and are most likely linked to variations in the N-terminal region. In contrast to the established calcium sensor syt2, endogenous cytosolic syt8 and transiently expressed syt8-C<sub>2</sub>AB-eGFP did not translocate upon a raise in cytosolic calcium in living cells. Syt8 is therefore not a calcium sensor in exocytotic membrane fusion in endocrine cells.

© 2005 Published by Elsevier B.V.

**Keywords:** Calcium-sensor; Subcellular distribution; Exocytosis; Translocation; Pancreatic  $\beta$ -cells; Synaptotagmin

## 1. Introduction

Synaptotagmins form a family of calcium-sensing proteins implicated in the regulation of membrane fusion in vesicular transport. They are endowed with a short hydrophilic N-terminus, followed by a transmembrane domain and two cytosolic C<sub>2</sub>-domains. The two isoforms of synaptotagmin (syt) which have been studied in most detail, syt1 and 2, bind phospholipids and SNARE proteins in a calcium-dependant fashion via the C<sub>2</sub>-domains. Thereby, they attach to lipid membranes and protein complexes involved in exocytosis [1,2]. Genetic, electrophysiological and biochemical evidences have established their role as a calcium-sensor in membrane fusion during exocytosis [1,3]. Several isoforms have been localised on defined subcellular compartments suggesting their implication in defined transport steps.

Whereas syt1, 2, 5 and 9 are found on synaptic vesicles and/or large dense core vesicles [4–6], syt3 and 6 are present on plasma membranes or adjacent structures [7,8], syt4 resides in proximity of the *trans*-Golgi network [8–10] and syt7 on lysosomes [11].

Synaptotagmins can be classified according to their biochemical properties or by sequence alignment [12–14]. The latter indicates a close relationship between syt1, 2, 5 and 8 as being paralogues [12–14]. Interestingly, syt1, 2 and 5 are implicated in the regulation of exocytosis of LDCVs in neuroendocrine and endocrine cells including insulin-secreting clonal  $\beta$ -cells [5,6,8,15,16]. In regard to syt8, we have previously observed that the corresponding mRNA is expressed in islets as well as derived clonal  $\beta$ -cells and that recombinant C<sub>2</sub>-domains of syt8 inhibit insulin exocytosis from permeabilised cells [8]. Recently, a crucial role for syt8 has been reported in calcium-induced membrane fusion during the acrosome reaction [17]. However, syt8 lacks several calcium-coordinating residues in each C<sub>2</sub> domain and it remains controversial whether

\* Corresponding author.

E-mail address: [j.lang@iecb.u-bordeaux.fr](mailto:j.lang@iecb.u-bordeaux.fr) (J. Lang).

syt8 binds synthetic phospholipids or recombinant SNARE proteins in a calcium-dependent fashion [12,17,18].

We have therefore addressed the expression and subcellular localisation of this isoform and examined membrane binding in living cells. Our data demonstrate that syt8 exists as a cytosolic and as a membrane bound form in primary neurons, neuroendocrine and endocrine cells. The cytosolic form of syt8 did not translocate to membranes upon increasing calcium in biochemical assays or in living cells thus excluding this isoform as a calcium sensor in membrane fusion.

## 2. Material and methods

### 2.1. Material

Glutathione sepharose 4B was obtained from Amersham Biosciences, (Saclay, France), collagenase from Roche Diagnostics (Saclay, France) and all other reagents were from Sigma (Lyon, France). The following commercial monoclonal antibodies were employed: anti-VAMP2 Cl 69.1 (Synaptic Systems, Göttingen, Germany); anti-SNAP25 (Sternberger Monoclonals, Lutherville, MD, USA); anti-Vti1a Cl45, anti-Vti1b Cl7, anti-BiP and anti-PDI (Transduction Laboratories, Erembodegem, Belgium); anti-calreticulin, anti-membrin and anti-syntaxin 6 (Stressgen; Victoria, BC, Canada); anti-GST, anti-insulin K36, anti-syntaxin/HPC-1, anti- $\beta$ COP, anti-Golgi 58 K and anti-synaptophysin/SVP38 (Sigma, Lyon, France). Several antibodies were kindly donated: anti-Ti VAMP Cl58.2 (Dr. T. Galli, Paris), anti-EEA1 (Dr. J. Grunberg, Genève) and anti-LAMP1 (Dr. Marie Luisa Malosio, Milano). HRP-linked anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies were purchased from Amersham Biosciences (Saclay, France), LysoTracker Red and Alexa-labelled anti-rabbit secondary antibody were obtained from Molecular Probes (Leiden, Netherlands). A plasmid encoding PKC $\alpha$ -eGFP was kindly provided by C. Larsson (University of Lund, Sweden), peGFP-ERGIC by H.P. Hauri (University of Basel, Switzerland), peGFP-rab7 by B. van Deurs (Panum Institute, Copenhagen), peGFP-CD63 by G. Griffiths (Cambridge University) and peGFP-SKL by T. Osumi (University of Hyogo, Japan) [19–22]. INS1-E cells were kindly provided by C.B. Wollheim and P. Maechler (Université de Genève). The previously published anti-syt8 antiserum, designated here as AS syt8, was generously donated by M.A. Knepper (NIH, Bethesda, USA) [23].

### 2.2. Molecular cloning and RT-PCR

Plasmids encoding the cytoplasmic domains of rat syt 1 to 3 and 5 to 8 fused to a GST tag were kindly provided by Dr. T. Sudhof [12]. DNA sequence encoding the cytoplasmic domain of murine syt 4 (residues 63 to 425) was excised from pSP73 (kind gift from Dr. B. Hilbush) [24] and subcloned into the *SmaI/XhoI* sites of pGEX4T-2. cDNA encoding cytoplasmic fragments of other synaptotagmins were amplified by RT-PCR using the following primer pairs (restriction sites underlined): syt 9 (from mouse brain, amino acids 48–386) 5'-AGGATCCTTCTGTCTCTACCGGAAGCG-3' and 5'-AGAATTCTCAGGGTGCAGGTATTGGC-3', syt 10 (from mouse brain cDNA, amino acids 92–523) 5'-AGCGGATCCAACCTCAGTGTCTTCC-3' and 5'-AGCGAATTCTTATGGTGTGGACGGTGGC-3', syt 11 (from EST AA050913; amino acids 36–430), 5'-GAAGATCTGTGTGGACGTGCTGCCACAGCAGGC-3' and 5'-TCGAATTCCTGACTCGCTCAGACTGTGC-CACTTGGC-3', Syt 13 (from MIN6 cells cDNA, amino acids 68–426) 5'-ACGGATCCACGGACCTGTCCAGC-3' and 5'-AGCGAATTCACAGGTGCAGTTGGTGGC-3'. The nomenclature of synaptotagmins is given according to Fukuda [25]. The PCR products, purified from an agarose gel by Microspin columns (Qiagen, Courtabouef, France), were directly inserted into the pGEM-T vector (Promega, Charbonnières, France), verified by sequencing of both strands and then subcloned into the *BamHI/EcoRI* sites of the pGEX-2T vector. The plasmid encoding Flag-syt8-C<sub>2</sub>AB was obtained by subcloning a *EcoRI/HindIII* fragment (amino acids 98–360) from pGEX-syt8C<sub>2</sub>AB into pCMV-tag. The plasmid coding for syt8C<sub>2</sub>AB-eGFP was obtained by amplification of the cytosolic domain of rat syt8 using the following primers

5'-TGGTGAATTCTAGACTCCATGGTTC-3' and 5'-TAGGATCCGAGC-GAGGCTAAGGAG-3'. The amplicon was digested with *EcoRI/BamHI*, cloned into the appropriate site of peGFP-N1 and sequenced on both strands. RNA from indicated sources was purified using Trizol, reverse transcribed and amplification by PCR was performed using the following primers (according to sequence NM\_018802 [26]): sense (nt 687–705), GCTGTGGGACTT-CAAGCGG; antisense (nt 1040–1023) ACGGGAACCAAGACG.

### 2.3. Polyclonal antibody production and immunoblotting

The polyclonal antibody against syt8 was produced by immunisation of New Zealand white rabbits with a synthetic peptide (CLALQPRLPLLRPR; amino acids 383 to 394 of Q9R0N6) coupled to KHL (Covalab; Lyon, France). The resulting antiserum was affinity-purified against the peptide (Syt8) coupled to sepharose and used throughout the study at a concentration of 35 ng/ml (immunoblots) or 140 ng/ml (immunofluorescence). This antibody is termed “anti-syt8 ip”. Recombinant proteins were obtained in *E. coli* BL21 (DE3), transformed with pGEX vectors. SDS-PAGE, immunoblots, visualisation and quantification was performed as published [27]. Attempts to use the antibody in immunoprecipitation were not successful (data not shown).

### 2.4. Cell culture and fluorescence microscopy

HIT-T15, MIN6 and INS1-E cells were cultured and transfected as described [8]. PC12 were generously provided by Dr. Brian Rudkin (ENS, Lyon, France) and cultured in DMEM supplemented with 7% foetal bovine serum and 7% horse serum. Primary hippocampal neurons were prepared from rat embryos as described previously [28]. The following siRNAs were used (Ambion): siRNA1 GGATAAAGAACTGTGGGCCT corresponding to nts 234–252 and siRNA2 GGGAAGTGATCGTGT corresponding to nts 1127–1144 of the rat sequence AF375467. Note that siRNA1 contains a mismatch in position 11 and was thus used as control. Confocal microscopy was performed as published and images were obtained using a LSM 510 META and a 100 $\times$  objective [27]. Fixation of cells either in paraformaldehyde or in methanol at  $-20^{\circ}\text{C}$  gave similar results for anti-syt8 ip although the latter preserved cytosolic staining to a larger extent. Permeabilisation with streptolysin-O was performed as described previously [8] and cells were subsequently incubated for 20 min in intracellular buffer (140 mM L-glutamic acid/monopotassium salt, 5 mM NaCl, 7 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.4 mM EGTA, 20 mM HEPES, pH 7) and washed once prior to fixation. Imaging of living cells was performed using an inverted microscope (Nikon TD300 equipped with a Z-drive) coupled to a monochromator (Till Photonics) and appropriate emission filters. Images were recorded by a CCD-camera (Micromax 1300Y HS, Roperts Scientific) using Metamorph software (Universal Imaging) and deblurred by deconvolution (Autodeblur, Universal Imaging). Cells on coverslips were kept either in Krebs–Ringer buffer or in intracellular buffer at  $37^{\circ}\text{C}$  on a heated stage during acquisition. Cells were stimulated either with ionomycin (10  $\mu\text{M}$ ) or using defined calcium buffers and 30  $\mu\text{M}$  digitonin. Concentrations of free calcium were obtained as described previously [29] or, in the case of concentrations above 10  $\mu\text{M}$ , calculated by winmaxc (<http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html>) using NTA and HEDTA [30]. Solutions were pressure ejected (3 psi, 10 s) from a micropipette held at approximately 10  $\mu\text{m}$  from the cell.

### 2.5. Postnuclear supernatants, subcellular fractionation and in vitro translocation

Cells were washed twice with PBS pH 7.4 (without Mg<sup>2+</sup>), detached by incubation with 10 mM EDTA-PBS for 5 min at  $37^{\circ}\text{C}$  and centrifuged at  $800\times g$  for 5 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Pelleted cells were resuspended in appropriate buffer for each experiment and sonicated for 2 min on ice. Brain extracts were prepared as published [6]. Postnuclear supernatants (PNS) were obtained by a 10-min centrifugation of cells or brain homogenates at  $1000\times g$  and at  $4^{\circ}\text{C}$ . Subcellular fractionation by velocity sedimentation on sucrose gradient was performed as described [31]. To fractionate brain homogenates, PNS was centrifuged at  $17,000\times g$  for 1 h yielding P2 (crude synaptosomal fraction) and S2 (soluble proteins). P2 was resuspended in hypotonic buffer (HEPES 10 mM pH 7.4) and further lysed by Dounce homogenization. Centrifugation at  $27,000\times g$  for 40

min at 4 °C separated soluble proteins from membranes (LP1). For separation of cell homogenates into membrane and cytosolic fraction, cells were resuspended in hypotonic buffer (Tris 25 mM pH 7, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Pepstatin, 1 µg/ml Leupeptin, 0.5 mM PMSF), sonicated and centrifuged at 100,000×g for 2 h at 4 °C. To determine calcium-dependent translocation, detached and pelleted MIN6 cells were incubated for 5 min at 37 °C in intracellular buffers supplemented with protease inhibitors (1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Pepstatin, 1 µg/ml Leupeptin, 0.5 mM PMSF) and either containing 2 mM EGTA or 2 mM CaCl<sub>2</sub> with 10 µM ionomycin. Subsequently they were sonicated on ice for 2 min, centrifuged at 160,000×g for 1 h at 4 °C and resuspended in EGTA or calcium buffer. Total protein contents were measured by Bradford assay (Biorad, Marnes-la-Coquette France) and insulin concentration was determined by ELISA (Mercodia, Uppsala Sweden).

### 3. Results

#### 3.1. Generation and characterisation of the antibody

Sequence comparison and prediction of antigenicity indicated a specific and sufficiently antigenic sequence in the C-terminus of syt8 to avoid cross-reactivity with other isoforms. In addition, splice variations are not predicted for the last exon in syt8 [14], the peptide is fully conserved in rat and mouse and blast searches using the last 30 amino acids of syt8 suggested the absence of similar sequences in the mouse genome. Specificity of the obtained and immunopurified antiserum, termed anti-syt8 ip, was tested against recombinant cytosolic domains of syt1 to 12 (Fig. 1A). Anti-syt8 ip recognized only syt8 but no other isoform tested. It should be noted that the recently identified isoforms syt 13 to 16, which have not been tested here, do not exhibit any homology to the C-terminus of syt8. We also used a previously published antiserum [23], named here AS Syt8, and compared it with anti-syt8 ip. As given in Fig. 1A, AS Syt8 was specific for synaptotagmin 8 and exhibited only some cross-reactivity to synaptotagmin 1.

#### 3.2. Expression of synaptotagmin 8

The antibody anti-syt8 ip recognized a single band of 40 kDa in homogenates from the insulinoma cells HIT-T15 cells (Fig. 1B) and stained an additional band of 35 kDa after over-expression of the C<sub>2</sub>AB domains of syt8 in this cell line. The 40-kDa immunoreactive band was also found in the insulinoma cell lines MIN6 and INS1-E as well as in pheochromocytoma PC12 cells (Fig. 1B, middle panel) which is in line with the known extra-neuronal expression of syt8 [12]. As shown in Fig. 1B, the intensity of the immunoreactive band in endocrine and neuroendocrine cells was completely abolished by co-incubation with the antigenic peptide further indicating the specificity of the antibody employed. In brain homogenates two bands were detected at 40 and about 50 kDa (Fig. 1B, right panel). Whereas the upper band was present in LP1 (synaptosomal plasma membranes and attached synaptic vesicles), the 40-kDa band was found in the S2 fraction which contains cytoplasm and synaptic vesicles [32].

We further examined the specificity the immunopurified antibody by comparing it with AS Syt8 and by the use of siRNA (Fig. 1C and D). The 40-kDa band is recognized by AS Syt8. In addition, a band at approximately 50 kDa is stained that can also

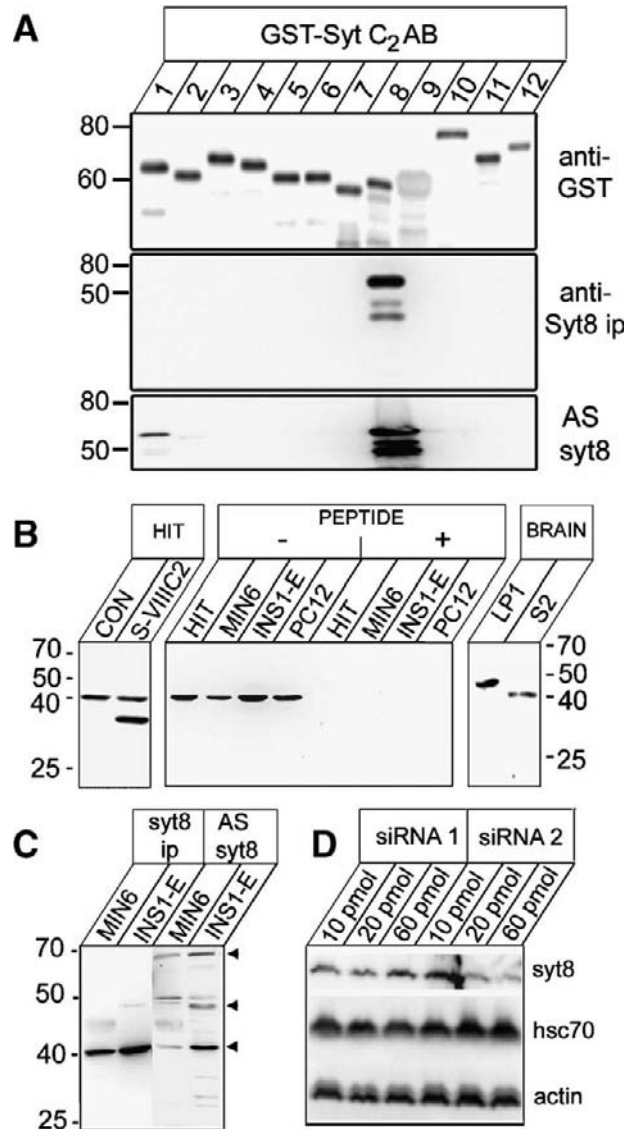


Fig. 1. Specificity of immunopurified anti-syt8 antibody. (A) Immunostaining of recombinant GST-fusion proteins of cytosolic domains of synaptotagmins (GST-sytC<sub>2</sub>AB) with anti-GST (upper panel), immunopurified anti-syt8 (antiSyt8 ip; middle panel) or a different anti-syt8 antiserum (AS Syt8; lower panel). Numbering of syt isoforms is given according to Fukuda [25]. (B) 60 µg of postnuclear supernatant from native HIT-T15 cells, HIT-T15 cells overexpressing Flag-syt8-C<sub>2</sub>AB (S-VIII-C2; left panel), from HIT-T15, MIN6, INS-1E or PC12 cells (middle panel) or LP1 and S2 fractions from mouse brain (right panel) were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-syt8 ip (35 ng/ml) in the absence or presence of antigenic peptide (middle panel). (C) Comparison of immunoreactivity of anti-syt8 ip or AS Syt8 on postnuclear supernatants from MIN6 and INS1-E cells. Major bands in INS1-E cells are indicated by arrows. (D) Transient transfection with siRNA2, but not with (control) siRNA1 reduced the expression of the 40-kDa band in postnuclear supernatants of INS1-E cells as evidenced by immunoblotting using anti-syt8 ip.

be detected, though faint, in INS1-E cells stained with anti-syt8 ip. Additional bands are apparent using AS syt8 such as a 65-kDa protein. This may represent synaptotagmin 1 in view of the cross-reactivity of the antiserum and the known expression of syt1 in insulin-secreting cell lines [6,8]. Transient transfection of INS1-E cells with the control siRNA (siRNA1) did not alter the expression levels of the 40-kDa protein whereas a



considerable reduction was observed after transient transfection of specific siRNA (siRNA2). In contrast, the expression levels of control proteins such as hsc70 and actin were not altered.

Alternative splicing of *syt8* may affect the N- and the C-terminus with variations at the first two or at the sixth of the eight exons present thereby yielding proteins with predicted molecular weights ranging from 25 and 40 to 44 kDa [14]. The relative migration observed in our experiments is therefore compatible with the expected forms of *syt8*. Our attempts to further characterise *syt8* in insulinoma cells by RT-PCR using sense primers located within the first or second exon were unsuccessful and may well be explained by the predicted transcript complexity affecting the N-terminus [14]. Another splice variant is given by the presence or absence of the 6th exon situated within the predicted C2B domain [14]. Using primers situated in the 5th and 7th exon, we obtained amplicons of the predicted size (353 bp) for the presence of the 6th exon (Fig. 2) indicating that this exon is expressed in clonal and primary  $\beta$ -cells.

### 3.3. Membrane-bound and cytosolic forms of synaptotagmin 8

To determine the subcellular distribution of *syt8* in more detail, we performed fractionation on a continuous sucrose gradient (Fig. 3) in MIN6 cells. The relative distribution of known organelle markers coincided with those reported previously for other insulinoma cells [6,31,33]. Secretory granules (insulin) migrated mainly at fractions 8 to 10 followed by the endoplasmic reticulum as given by the distribution of calreticulin (Fig. 3A). The SNARE proteins syntaxin and SNAP25 were mainly found in fractions 6 to 8 compatible with the density of approximately 1 expected for fractions containing plasma membranes. The broad distribution of the two markers reflects their known presence also on endocytotic compartments. The vesicular protein synaptophysin/SVP38, a marker of synaptic-like microvesicles and endocytotic compartments, was mainly enriched in fraction 5 at a density of approximately 0.9 (Fig. 3B). In contrast, *syt8* migrated in the first fractions of the gradient, a behaviour compatible with a cytosolic protein. After long exposure of the blots we detected also the 50-kDa band which was concentrated in fractions of higher density (0.9 M sucrose). No additional band was observed below or above these two proteins. To examine the specificity of this band, we compared the migration of immunoreactive bands on a similar

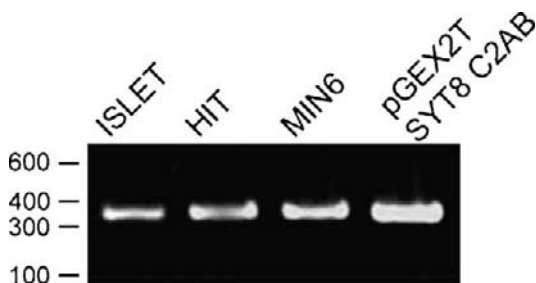


Fig. 2. The sixth exon is present in *syt8* mRNA from islets and clonal  $\beta$ -cells. mRNA from indicated sources was amplified using primers situated in the 5th and 7th exon and separated on agarose gels.

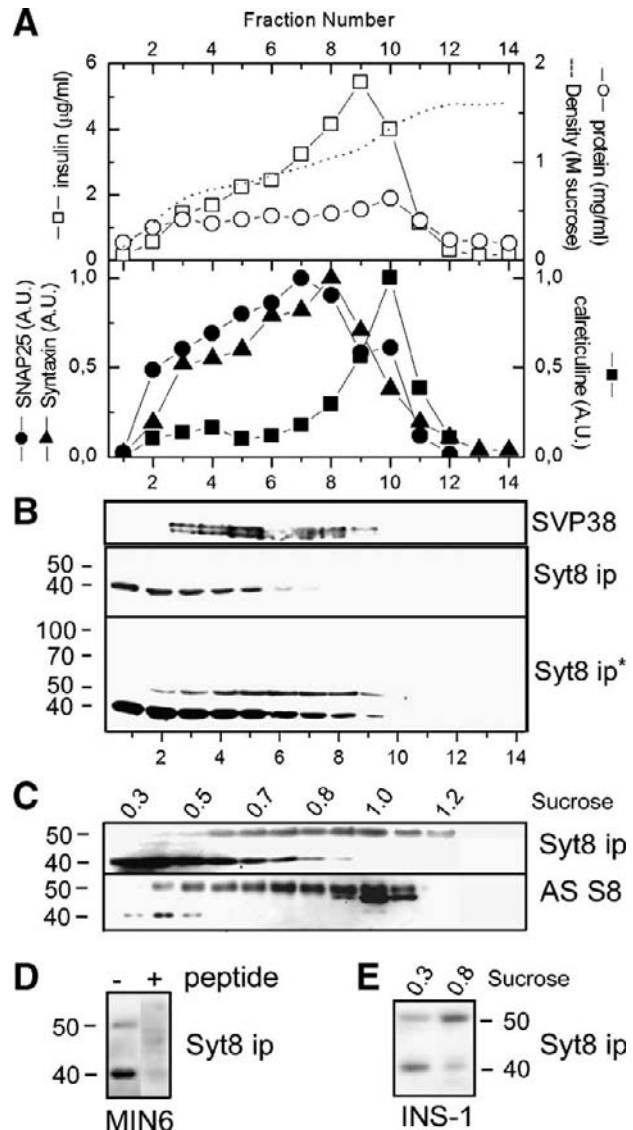


Fig. 3. Subcellular distribution of synaptotagmin 8 in clonal  $\beta$  MIN6 cells. (A) Postnuclear supernatants were fractionated on a continuous sucrose gradient and 14 fractions (0.5 ml each) were analyzed for total protein, insulin, density (upper graph) and distribution of SNAP25, syntaxin or calreticulin (lower graph). (B) Immunoblot for synaptophysin (SVP38) and *syt8* after short exposure (*syt8* ip) or prolonged exposure (*syt8* ip\*). (C) Using a similar gradient, the distribution of immunoreactivity for anti-*syt8* ip and for AS *syt8* were compared. The corresponding sucrose concentrations of this gradient are indicated. (D) An aliquot of the 0.7-M sucrose fraction shown in C was incubated with anti-*syt8* ip in the absence or presence of peptide (10  $\mu$ M). (E) Postnuclear supernatants of INS1-E cells were separated on a sucrose gradient and two fractions (0.3 M and 0.8 M sucrose) were compared for the expression of the 40- and the 50-kDa band.

gradient using anti-*syt8* ip and AS *syt8* (Fig. 3C). Both bands were recognized by the two antibodies and their distribution over the gradient was comparable in terms of immunoreactivity for anti-*syt8* ip and for AS *syt8*. An additional band of 48 kDa, visible between 0.9 and 1.1 M sucrose, was only apparent for AS *syt8*.

To ensure the specificity of the 40- and 50-kDa band, we tested whether the immunoreactivity against both bands can be blocked by the antigenic peptide. As shown in Fig. 3D, this was

indeed the case. Both proteins were present in postnuclear supernatants of INS1-E cells (see Fig. 1C) although the slower migrating band was faint (see Fig. 1C). To test for the presence of the 50-kDa form in INS1-E cells, we also examined fractions obtained by a sucrose density gradient (Fig. 3E). Similar to our observations in MIN6 cells, the 50-kDa form was found enriched at 0.8 M sucrose thus demonstrating its expression also in this cell line.

#### 3.4. The membrane bound form of synaptotagmin 8 partially colocalises with Vti1a

To investigate further the distribution of synaptotagmin 8, we performed immunochemical staining of clonal  $\beta$ -cells (Fig. 4). Using anti-syt8 ip or AS Syt8, immunoreactivity was dispersed throughout the cytosol, most likely corresponding to the 40-kDa protein, and an additional discrete punctuate staining was observed in MIN6 and INS1-E cells (Fig. 4A–D). A similar distribution was also apparent in HIT-T15 cells (data not shown). Although major features in staining were conserved between anti-syt8ip and AS Syt8, minor differences are notable such as a greater number of puncta in the latter. This may be due to cross-reactivity of AS Syt8 with synaptotagmin 1 (see Fig. 1A) known to be expressed on synaptic like microvesicles and large dense core granules in insulin secreting cells [6]. In addition, the cytosolic stain was less evident for AS Syt8 which is in line with the weaker recognition of the 40-kDa protein in immunoblots.

We further concentrated on the discrete punctua observed with anti-syt8 ip to ascertain its specificity and define the relevant structure or organelle. To this end imaging parameters were employed which mainly visualised the punctuate staining. The picture shown in Fig. 4E gives a representative image as obtained by Z-sectioning and 3D reconstruction in INS1-E cells. Staining of 30 to 50 particles per cell were observed and these organelles were never found at the plasma membrane. The magnification provided in Fig. 4E (right panel) demonstrates the typical aspect of these organelles which most often appeared in clusters. We further examined the specificity of the staining. First, it was still apparent after permeabilisation of cells with streptolysin-O and a buffer wash (Fig. 4F) suggesting that the epitope recognized by the antibody is tightly associated with membranes. Preincubation of anti-syt8 ip with the peptide abolished the immunoreactivity (Fig. 4H) as compared to the absence of the peptide (Fig. 4G). Moreover, immunoreactivity was absent in cells cotransfected with siRNA2 (Fig. 4L), but not in cells co-transfected with siRNA1 (Fig. 4K). The punctate staining was also considerably altered after preincubation with nocodazole, which depolymerises tubulin (Fig. 4M). In contrast, pre-treatment with brefeldin A did not alter the distribution of anti-syt8ip immunoreactivity (data not shown). Using a monoclonal antibody against Vti1a, a presumed Golgi SNARE protein [34], a certain degree of colocalisation was apparent (Fig. 4N). Comparable results were obtained with AS syt8 (data not shown). Although a number of syt8-positive organelles stained for Vti1a, the latter clearly exhibited a wider distribution. We had therefore conducted a vast survey for

colocalisation with other intracellular structures which, however, remained negative. Indeed, anti-syt8 ip staining did not colocalise with markers for peroxisomes (peGFP-SKL), the endoplasmic reticulum (BiP, calreticulin), the intermediate compartment (ERGIC-eGFP), transport vesicles ( $\beta$ -COP), Golgi membranes (membrin, G58k, Vti1b, syntaxin 6), exocytotic vesicles (insulin, synaptophysin) or endocytic compartments (Ti-VAMP, LAMP1, rab7-eGFP, EEA1, lysotracker, CD63-eGFP) (data not shown). Similarly, the distribution of transferrin receptors, cytochrome *c* oxidase or GLUT2 did not have any resemblance to the localisation of syt8 in INS1-E cells (data not shown).

Interestingly, a comparable intracellular distribution of anti-syt8 ip immunoreactivity was apparent in the neuroendocrine cell line PC12 and in primary neurons. In both cells a limited number of rather large structures were apparent (Fig. 5). In neurons, anti-syt8 ip immunoreactivity was strictly confined to the soma as demonstrated by co-staining for synaptophysin, a marker of synaptic vesicles, and comparison with the phase picture.

#### 3.5. Cytosolic synaptotagmin 8 does not translocate in response to calcium

Synaptotagmin 8 was originally described as an isoform which does not bind SNARE proteins or phospholipids in a calcium-dependent manner [12,18]. Most recently, however, it was reported that the cytosolic domain of syt8 still binds to the SNARE proteins syntaxin 1 or SNAP25 in a calcium-dependent manner [13]. We therefore tested whether the cytosolic form of syt8 expressed in insulinoma cells is capable to bind to membranes in a calcium-dependent fashion. As shown in Fig. 6, ultracentrifugation in hypotonic buffer of postnuclear supernatants from insulinoma cells demonstrated again the soluble nature of the endogenous protein. We subsequently tested whether this protein is capable to translocate to biological membranes upon an increase in free calcium. To this end cells were incubated in intracellular buffer in the presence of ionomycin without or with calcium, homogenized and separated into soluble and membrane fractions by ultracentrifugation. Under these conditions syt8 remained soluble whereas the integral membrane proteins VAMP2 and syntaxin were recovered in the membrane fraction. (Fig. 6). In addition, transiently expressed protein kinase C $\alpha$  fully translocated under those conditions. We further compared the behaviour of the cytosolic domain of syt8 with that of syt2 in living cells. To this end eGFP-tagged fusion proteins were expressed in MIN6 cells. This assay measures interactions with endogenous phospholipids and avoids the problem of contamination of recombinant proteins by bacterial lipids [35]. As shown in Fig. 6, exposure of cells to the calcium ionophore ionomycin induced translocation of syt2C<sub>2</sub>AB, whereas syt8C<sub>2</sub>AB remained dispersed throughout the cell. Stimulation with the calcium mobilizing agent thapsigargin (1  $\mu$ M) or carbachol (0.1 mM) did not alter the distribution of syt8C<sub>2</sub>AB (data not shown). Using defined calcium buffers and digitonin to perforate the plasma membrane, we compared the calcium sensitivity of the two

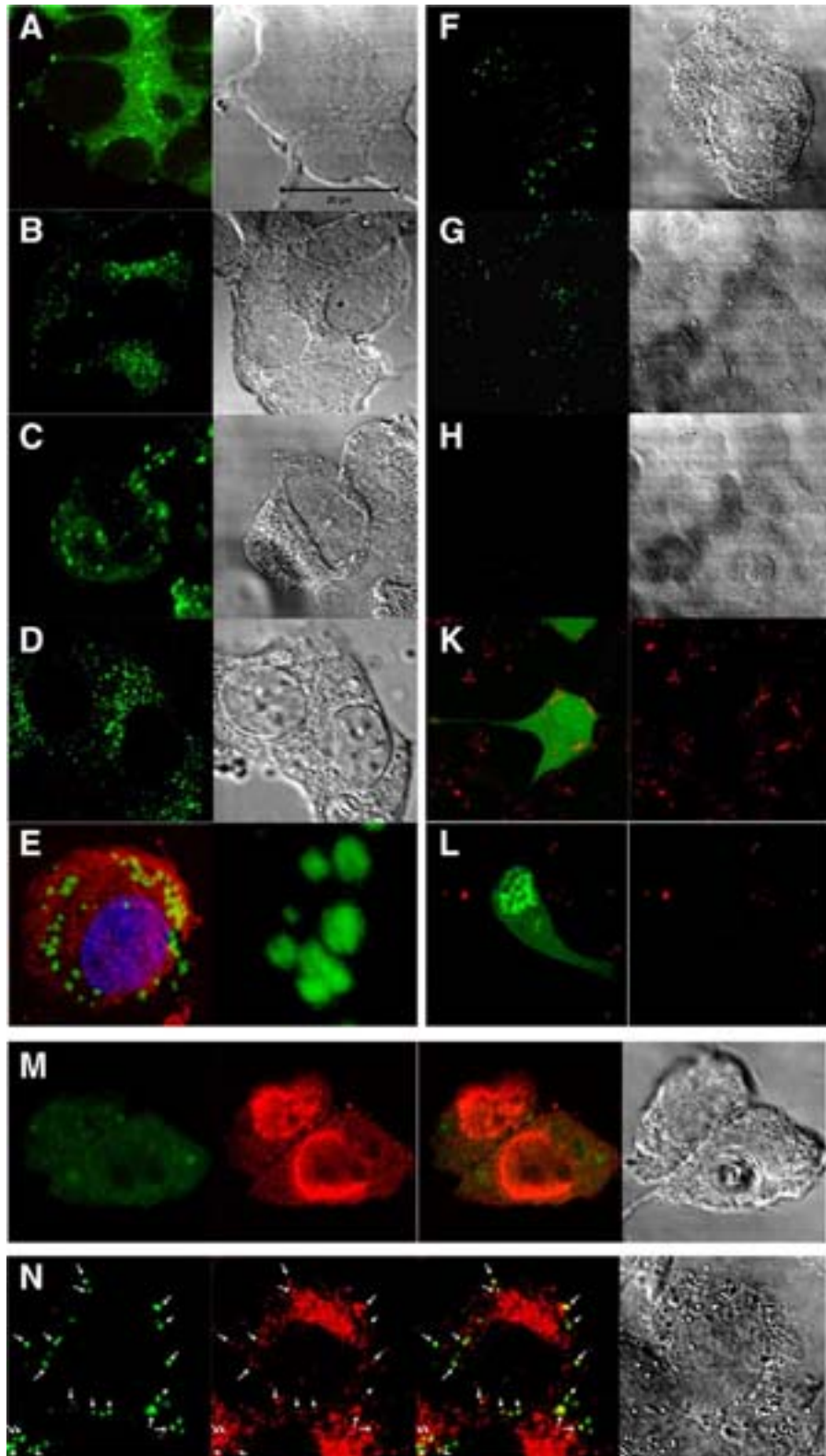


Fig. 4. Immunoreactivity of MIN6 or INS1-E cells using anti-syt8 ip or AS syt8. MIN6 cells are given in panels A and B, all other panels show results using INS1-E cells. Cells stained with AS syt8 (B and D) exhibit immunofluorescence similar to those stained with anti-syt8 ip (A, C), i.e., a cytosolic and a granular pattern. (E to N) Staining with anti-syt8 ip and imaging using parameters that image mainly the granular pattern. (E) Pseudo-3D presentation staining with anti-syt8 ip (FITC), syntaxin 1 (TRITC) and Hoechst X (blue) to demonstrate the cellular distribution of anti-syt8 ip staining. (F) Enlarged view of a group of syt8-positive structures. (G) Permeabilisation with streptolysin-O and washes prior to fixation and staining with anti-syt8 ip. (G and H) Staining without (G) or with preincubation (H) of anti-syt8 ip with the antigenic peptide (10  $\mu$ M). (K and L) Staining with anti-syt8 ip of cells co-transfected with eGFP and (control) siRNA1 (K) or siRNA2 (L). (M) Staining with anti-syt ip (FITC) and anti-tubulin (TRITC) after pre-treatment with nocodazole (5  $\mu$ g/ml, 1 h, 37  $^{\circ}$ C). (N) With anti-syt ip (FITC) and anti-Vti1a (TRITC). Colocalisations of visualised structures are indicated by arrows.



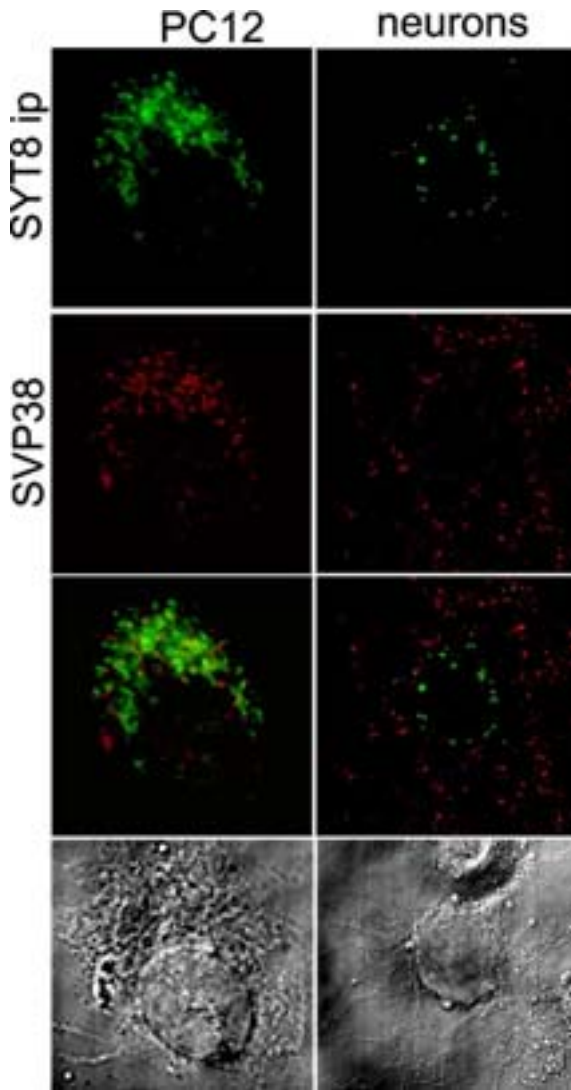


Fig. 5. Immunoreactivity of primary hippocampal neurons or PC12 cells using anti-syt8 ip. Cells were stained with anti-syt8 ip (FITC) and anti-synaptophysin (TRITC).

constructs. Syt2C<sub>2</sub>AB translocated with an EC<sub>50</sub> of about 2  $\mu$ M of free calcium whereas even 1 mM free calcium was unable to induce translocation of syt8C<sub>2</sub>AB.

#### 4. Discussion

Characterisation of synaptotagmins has allowed assigning specific localisation and functional roles to several isoforms of this family [1]. The expression of multiple splice variants adds another layer of diversity to the system [14,36,37]. Clearly, the precise identification and precise localisation of the endogenous protein is important. We have therefore immunopurified and carefully characterised our antibody. Its specific recognition of a soluble 40 kDa and a membrane-bound 50 kDa form of synaptotagmin 8 is supported by our data using recombinant synaptotagmin 1 to 12, blockade of recognition by the antigen in immunoblots and immunofluorescence as well as a decrease after transfection with corresponding siRNAs. Moreover,

similar results were obtained in direct comparison with another, previously published antibody. Note that we did not detect any form of higher molecular weight.

Previous studies on endogenous syt8 reported apparent molecular weights of 40 and 50 kDa in brain or kidney and of 40 and 70 kDa in sperm membranes using anti-peptide antibodies [23,38]. Recognition of a 40-kDa protein and of the 50-kDa protein is in line with our study. Transiently expressed full-length syt8 endowed with an epitope-tag migrates at approximately 43 kDa [39]. As synaptotagmins can undergo posttranslational modifications with a corresponding increase in their apparent molecular weight [40,41],

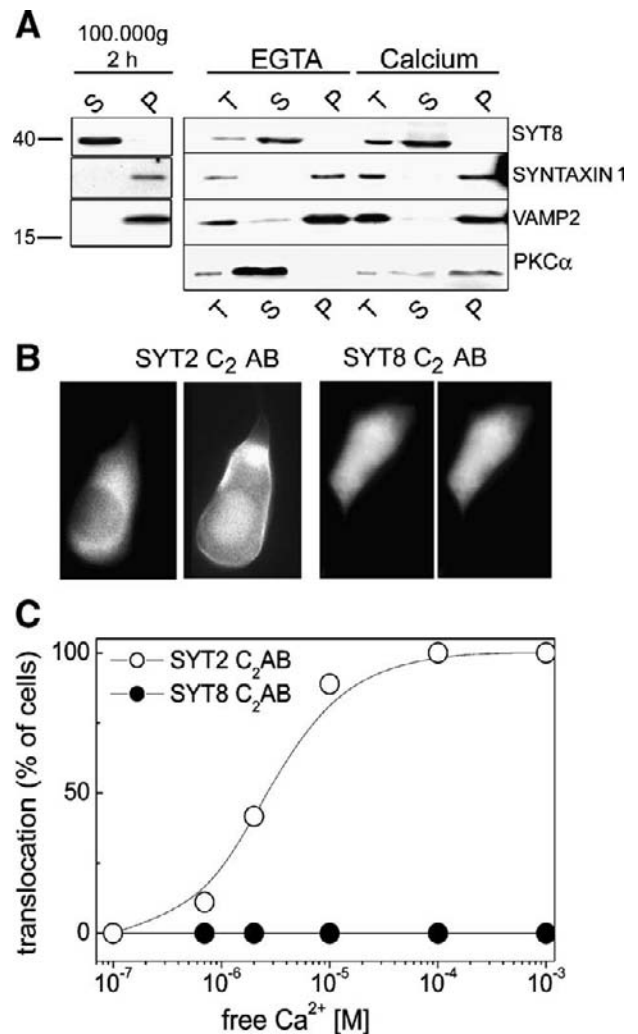


Fig. 6. Synaptotagmin 8 does not translocate upon increases in intracellular calcium. (A) Biochemical characterisation: MIN6 cells were incubated in hypotonic buffer (left panel) or in intracellular buffers in the presence of EGTA (EGTA) or of 2 mM calcium and 10 mM ionomycin (Calcium) at 37 °C, sonicated and ultracentrifuged. An aliquot of the initial sample (T) and obtained supernatants (S) or pellets (P) were immunoblotted for syt8 (using anti-syt8 ip), syntaxin 1 and VAMP2. (B) MIN6 cells transiently expressing syt2C<sub>2</sub>AB-eGFP or syt8C<sub>2</sub>AB-eGFP kept in KRB (1 mM calcium) were stimulated with 10  $\mu$ M ionomycin. Representative frames prior to and 30 s after stimulation are given. (C) Translocation of syt-eGFP in living cells kept in intracellular buffer and exposed for 10 s to indicated concentrations of free calcium and 30  $\mu$ M digitonin. 3 to 11 cells were imaged for each concentration.



the 50-kDa protein probably represents the full-length endogenous synaptotagmin 8.

The detection of a major 40 kDa form was clearly surprising. Interestingly, the major immunoreactive band in sperm membranes detected with an antibody directed against a sequence corresponding to the linker between the two C<sub>2</sub> domains exhibited also an apparent molecular weight of 41 kDa [38]. Our antibody was directed against the C-terminus and we did not detect any variations by RT-PCR in the 6th exon encompassing the second C<sub>2</sub> domain. Differences between the two forms should therefore reside within the N-terminal region. Indeed, a complex pattern of alternative splicing has been predicted for the N-terminus of syt8 thereby yielding proteins with predicted molecular weights ranging from 25 and to 44 kDa [14]. This complexity may also explain our failure to amplify this region by RT-PCR. Note also that spliced N-terminal EST clones are absent from the different databases. We cannot formally exclude that the 41-kDa form of syt 8 is generated by proteolytic cleavage of the 50-kDa protein. However, the differential distribution observed by immunocytochemistry coincides with the migration on the sucrose gradient and renders unlikely the occurrence of a proteolytic artefact during fractionation.

The two forms of syt8 observed in  $\beta$ -cells distributed to distinct compartments, a soluble 41 kDa form in the cytosol and a minor 50 kDa membrane-bound. Exon skipping leading to the absence of transmembrane domains have been reported previously for several synaptotagmins [36] and a differential distribution similar to syt8 had been described in the case of full-length and alternatively spliced syt6 [37]. Despite our efforts we could only partially characterise the structure bearing synaptotagmin 8. The effect of microtubule disruption by nocodazole suggests the expression of synaptotagmin 8 on a dynamic compartment. Partial colocalisation was apparent for Vt1a, a vesicular SNARE protein [34]. Although this protein has been described as residing at the TGN and derived vesicles, a localisation insensitive to brefeldin A has been reported recently in adipocytes where Vt1a regulates trafficking of the glucose transporter GLUT4 [42]. Similarly, brefeldin A did not alter the subcellular distribution of syt8 in our cells. We do not think that membrane bound syt8 intervenes in the regulation of glucose transport in  $\beta$ -cells also it is expressed not only in clonal but also in primary cells [8]. Indeed, at least the majority of the physiologically relevant glucose transporter in clonal and primary  $\beta$ -cells, GLUT2, had a distribution very distinct from that of syt8 in INS1-E cells (data not shown). Vt1a is, however, found on aquaporin 2 containing vesicles in renal collecting duct cells as recently evidenced by a proteomic analysis [43] and synaptotagmin 8 may eventually intervene in the exocytosis of channels and transporters in these cells [23] and other tissues such as  $\beta$ -cells. As other N-terminal splice variants might exist [14], we cannot exclude that those variants may eventually localise to exocytotic compartments in cell types different from those than investigated here.

Both forms of synaptotagmin 8 may intervene in distinct transport steps and recombinant syt8 C2AB inhibits insulin

exocytosis from permeabilised  $\beta$ -cells [8] or sperm acrosome reaction, a well characterised model of membrane fusion [17]. Obviously such an approach probes for the affinity of the effector but does not necessarily imply syt8 itself in the physiological regulation of exocytosis. Indeed, we were unable to detect any binding to membranes in homogenized or living cells in the absence or presence of calcium, whereas other C2-domain containing proteins such as protein kinase C $\alpha$  or the cytosolic domain of syt2 completely translocated. This is in line with the known changes in calcium-coordinating aspartates or glutamates in syt8. Whereas the first aspartate in the C<sub>2</sub>A domain is lacking in syt8, the third aspartate of the C<sub>2</sub>B domain is replaced by alanine [12].

Syt8 has been reported to bind in a cation-insensitive manner to the soluble second messenger inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate via a polybasic motif in its C<sub>2</sub>B domain [44]. A small, transient increase in this compound has been observed during stimulation of  $\beta$ -cells by carbachol [45,46]. This agent did not alter the distribution of syt8 C<sub>2</sub>AB-eGFP in living cells but we cannot exclude that minor changes had escaped our attention.

In conclusion, our observations indicate that, similar to several other synaptotagmins [14,36,37], two forms of syt8 exist in secretory and neuronal cells with a differential distribution most likely due to alternative splicing. Our observations also strongly suggest that syt8 is not a calcium sensor in endocrine cells or neurons and does thus not participate in the calcium-mediated regulation of evoked exocytosis.

## Acknowledgements

We thank Marie-Noëlle Benassy for excellent technical assistance and Dr. Naima Moustaid-Moussa for helpful suggestions on the manuscript. This work was supported by grants from the Region of Aquitaine and the University of Bordeaux I (BQR2003/4).

## References

- [1] R. Jahn, T. Lang, T.C. Sudhof, Membrane fusion, *Cell* 112 (2003) 519–533.
- [2] J.H. Evans, S.H. Gerber, D. Murray, C.C. Leslie, The calcium binding loops of the cytosolic phospholipase A2 C2 domain specify targeting to Golgi and ER in live cells, *Mol. Biol. Cell* 15 (2004) 371–383.
- [3] T.W. Koh, H.J. Bellen, Synaptotagmin I, a Ca<sup>2+</sup> sensor for neurotransmitter release, *Trends Neurosci.* 26 (2003) 413–422.
- [4] M. Geppert, B.T. Archer III, T.C. Sudhof, Synaptotagmin II. A novel differentially distributed form of synaptotagmin, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 13548–13552.
- [5] M. Fukuda, J.A. Kowalchuk, X. Zhang, T.F. Martin, K. Mikoshiba, Synaptotagmin IX regulates Ca<sup>2+</sup>-dependent secretion in PC12 cells, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 4601–4614.
- [6] J. Lang, M. Fukuda, H. Zhang, K. Mikoshiba, C.B. Wollheim, The first C2 domain of synaptotagmin is required for exocytosis of insulin from pancreatic  $\beta$ -cells: action of synaptotagmin at low micromolar calcium, *EMBO J.* 16 (1997) 5837–5846.
- [7] S. Butz, R. Fernandez-Chacon, F. Schmitz, R. Jahn, T.C. Sudhof, The subcellular localizations of atypical synaptotagmins III and VI. Synaptotagmin III is enriched in synapses and synaptic plasma membranes but not in synaptic vesicles, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 18290–18296.

- [8] A. Gut, C.E. Kiraly, M. Fukuda, K. Mikoshiba, C.B. Wollheim, J. Lang, Expression and localisation of synaptotagmin isoforms in endocrine beta-cells: their function in insulin exocytosis, *J. Cell Sci.* 114 (2001) 1709–1716.
- [9] F. Berton, V. Cornet, C. Iborra, J. Garrido, B. Dargent, M. Fukuda, M. Seagar, B. Marqueze, Synaptotagmin I and IV define distinct populations of neuronal transport vesicles, *Eur. J. Neurosci.* 12 (2000) 1294–1302.
- [10] K. Ibata, M. Fukuda, T. Hamada, H. Kabayama, K. Mikoshiba, Synaptotagmin IV is present at the Golgi and distal parts of neurites, *J. Neurochem.* 74 (2000) 518–526.
- [11] I. Martinez, S. Chakrabarti, T. Hellevik, J. Morehead, K. Fowler, N.W. Andrews, Synaptotagmin VII regulates  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent exocytosis of lysosomes in fibroblasts, *J. Cell Biol.* 148 (2000) 1141–1149.
- [12] C. Li, B. Ullrich, J.Z. Zhang, R.G. Anderson, N. Brose, T.C. Sudhof,  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent and -independent activities of neural and non-neural synaptotagmins, *Nature* 375 (1995) 594–599.
- [13] C. Rickman, M. Craxton, S. Osborne, B. Davletov, Comparative analysis of tandem C2 domains from the mammalian synaptotagmin family, *Biochem. J.* 378 (2004) 681–686.
- [14] M. Craxton, Synaptotagmin gene content of the sequenced genomes, *BMC Genomics* 5 (2004) 43, doi:10.1186/1471-2164-5-43.
- [15] L.A. Elferink, M.R. Peterson, R.H. Scheller, A role for synaptotagmin (p65) in regulated exocytosis, *Cell* 72 (1993) 153–159.
- [16] M. Iezzi, G. Kouri, M. Fukuda, C.B. Wollheim, Synaptotagmin V and IX isoforms control  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent insulin exocytosis, *J. Cell Sci.* 117 (2004) 3119–3127.
- [17] D. Hutt, J. Baltz, J. Ngsee, Synaptotagmin VI and VIII and syntaxin 2 are essential for the mouse sperm acrosome reaction, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 20197–20203.
- [18] W.C. Tucker, J.M. Edwardson, J. Bai, H.J. Kim, T.F. Martin, E.R. Chapman, Identification of synaptotagmin effectors via acute inhibition of secretion from cracked PC12 cells, *J. Cell Biol.* 162 (2003) 199–209.
- [19] A. Raghunath, M. Ling, C. Larsson, The catalytic domain limits the translocation of protein kinase C alpha in response to increases in  $\text{Ca}^{2+}$  and diacylglycerol, *Biochem. J.* 370 (2003) 901–912.
- [20] H. Ben-Tekaya, K. Miura, R. Pepperkok, H.P. Hauri, Live imaging of bidirectional traffic from the ERGIC, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 357–367.
- [21] C. Bucci, P. Thomsen, P. Nicoziani, J. McCarthy, B. van Deurs, Rab7: a key to lysosome biogenesis, *Mol. Biol. Cell* 11 (2000) 467–480.
- [22] N. Hashiguchi, T. Kojidani, T. Imanaka, T. Haraguchi, Y. Hiraoka, E. Baumgart, S. Yokota, T. Tsukamoto, T. Osumi, Peroxisomes are formed from complex membrane structures in PEX6-deficient CHO cells upon genetic complementation, *Mol. Biol. Cell* 13 (2002) 711–722.
- [23] B.K. Kishore, J.B. Wade, K. Schorr, T. Inoue, B. Mandon, M.A. Knepper, Expression of synaptotagmin VIII in rat kidney, *Am. J. Physiol.* 275 (1998) F131–F142.
- [24] B.S. Hilbush, J.I. Morgan, A third synaptotagmin gene, *Syt3*, in the mouse, *Proc. Nat'l Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 8195–8199.
- [25] M. Fukuda, Molecular cloning, expression, and characterization of a novel class of synaptotagmin (*Syt XIV*) conserved from *Drosophila* to humans, *J. Biochem. (Tokyo)* 133 (2003) 641–649.
- [26] M. Fukuda, E. Kanno, K. Mikoshiba, Conserved N-terminal cysteine motif is essential for homo- and heterodimer formation of synaptotagmins III, V, VI, and X, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 31247–31251.
- [27] F. Boal, H. Zhang, C. Tessier, P.A. Scotti, J. Lang, The variable C-terminus of cysteine string proteins modulates exocytosis and protein–protein interactions, *Biochemistry* 43 (2004) 16212–16223.
- [28] L. Fourgeaud, A.S. Bessis, F. Rossignol, J.P. Pin, J.C. Olivo-Marin, A. Hemar, The metabotropic glutamate receptor mGluR5 is endocytosed by a clathrin-independent pathway, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 12222–12230.
- [29] J. Lang, R. Regazzi, C.B. Wollheim, in: K. Aktories (Ed.), *Bacterial Toxins: Tools in Cell Biology*, Chapman and Hall, Weinheim, 1997, pp. 217–240.
- [30] C. Patton, S. Thompson, D. Epel, Some precautions in using chelators to buffer metals in biological solutions, *Cell Calcium* 35 (2004) 427–431.
- [31] H. Zhang, W.L. Kelley, L.H. Chamberlain, R.D. Burgoyne, J. Lang, Mutational analysis of cysteine-string protein function in insulin exocytosis, *J. Cell Sci.* 112 (Pt. 9) (1999) 1345–1351.
- [32] R. Jahn, W. Schiebler, C. Ouimet, P. Greengard, A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82 (1985) 4137–4141.
- [33] J. Lang, I. Nishimoto, T. Okamoto, R. Regazzi, C. Kiraly, U. Weller, C.B. Wollheim, Direct control of exocytosis by receptor-mediated activation of the heterotrimeric GTPases  $G_1$  and  $G_o$ , or by the expression of their active  $G\alpha$  subunits, *EMBO J.* 14 (1995) 3635–3644.
- [34] V. Kreykenbohm, D. Wenzel, W. Antonin, V. Atlachkine, G.F. von Mollard, The SNAREs *vti1a* and *vti1b* have distinct localization and SNARE complex partners, *Eur. J. Cell Biol.* 81 (2002) 273–280.
- [35] J. Ubach, Y. Lao, I. Fernandez, D. Arac, T.C. Sudhof, J. Rizo, The C2B domain of synaptotagmin I is a  $\text{Ca}^{2+}$ -binding module, *Biochemistry* 40 (2001) 5854–5860.
- [36] M. Craxton, M. Goedert, Alternative splicing of synaptotagmins involving transmembrane exon skipping, *FEBS Lett.* 460 (1999) 417–422.
- [37] M. Fukuda, K. Mikoshiba, A novel alternatively spliced variant of synaptotagmin VI lacking a transmembrane domain. Implications for distinct functions of the two isoforms, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 31428–31444.
- [38] D.M. Hutt, R.A. Cardullo, J.M. Baltz, J.K. Ngsee, Synaptotagmin VIII is localized to the mouse sperm head and may function in acrosomal exocytosis, *Biol. Reprod.* 66 (2002) 50–56.
- [39] M. Fukuda, E. Kanno, Y. Ogata, K. Mikoshiba, Mechanism of the SDS-resistant synaptotagmin clustering mediated by the cysteine cluster at the interface between the transmembrane and spacer domains, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 40319–40325.
- [40] M. Fukuda, Vesicle-associated membrane protein-2/synaptobrevin binding to synaptotagmin I promotes O-glycosylation of synaptotagmin I, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 30351–30358.
- [41] M. Veit, T.H. Sollner, J.E. Rothman, Multiple palmitoylation of synaptotagmin and the t-SNARE SNAP-25, *FEBS Lett.* 385 (1996) 119–123.
- [42] A. Bose, A. Guilherme, S. Huang, A.C. Hubbard, C.R. Lane, N.A. Soriano, M.P. Czech, The v-SNARE *Vti1a* regulates insulin stimulated glucose transport and ACRP30 secretion in 3T3L1 adipocytes, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 36946–36951.
- [43] M. Barile, T. Pisitkun, M.J. Yu, C.L. Chou, M.J. Verbalis, R.F. Shen, M.A. Knepper, Large scale protein identification in intracellular aquaporin-2 vesicles from renal inner medullary collecting duct, *Mol. Cell Proteomics* 4 (2005) 1095–1106.
- [44] K. Ibata, M. Fukuda, K. Mikoshiba, Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate binding activities of neuronal and non-neuronal synaptotagmins. Identification of conserved amino acid substitutions that abolish inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate binding to synaptotagmins III, V, and X, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 12267–12273.
- [45] C.A. Alter, B.A. Wolf, Identification of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in pancreatic islets and insulin-secreting beta-cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208 (1995) 190–197.
- [46] T.J. Biden, B. Peter Riesch, W. Schlegel, C.B. Wollheim,  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated generation of inositol 1,4,5-triphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate in pancreatic islets. Studies with  $\text{K}^+$ , glucose, and carbamylcholine, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 3567–3571.

## Discussion

Dans cette étude, nous avons généré et caractérisé un anticorps spécifique dirigé contre l'extrémité C-terminale de Syt 8 afin de déterminer la localisation sous cellulaire de Syt 8 dans différentes lignées. Cet anticorps révèle deux formes de Syt 8 dans les cellules insulino-sécrétoires, les PC12 et le cerveau. Une de ces formes correspond à une protéine cytosolique de 40 kDa et l'autre à une protéine membranaire de 50 kDa. La différence de taille observée entre ces deux isoformes est probablement due à un épissage alternatif au niveau de la région N-terminale (Craxton, 2004b). L'utilisation d'un siRNA dirigé contre la protéine Syt 8 a confirmé l'identité de la forme soluble Syt 8 de 40 kDa.

Nous avons ensuite cherché à caractériser ces deux formes de Syt 8. Ainsi, nous avons étudié la capacité de la protéine soluble endogène ou du domaine cytoplasmique de Syt 8 couplé à la GFP de se lier aux membranes en présence de calcium. Aucune association de ces deux protéines aux membranes n'a été observée *in vitro* et *in vivo*, même pour de fortes concentrations calciques (2 mM). Le comportement de Syt 8 peut s'expliquer par le fait que Syt 8 ne possède pas tous les résidus nécessaires à la fixation des ions calcium. L'isoforme Syt 8 ne serait donc pas un senseur calcique.

L'anticorps spécifique a aussi permis de localiser la forme membranaire de Syt 8 au niveau d'un compartiment qui co-localise partiellement avec la protéine SNARE vésiculaire, Vti1a. Cette protéine marque l'appareil de Golgi. Dans certaines lignées cellulaires dérivant des cellules musculaires, Vti1a co-localise avec les vésicules contenant le transporteur du glucose, GLUT-4. Nous avons donc recherché une éventuelle co-localisation de l'isoforme GLUT-2, exprimée dans les cellules  $\beta$ , et de Syt 8 dans les lignées insulino-sécrétoires. Cependant, ces deux protéines présentent une distribution très distincte dans les cellules INS-1E. Syt 8 ne présente aucune co-localisation avec les granules d'exocytose contenant l'insuline ou les compartiments endocytotiques.

D'après ces observations, Syt 8 présente au moins deux variants d'épissage dans les cellules endocrines et neuronales, ayant des distributions sous-cellulaires distinctes. L'ensemble des données biochimiques et des données d'immunofluorescence permet de conclure que Syt 8 n'est pas un senseur calcique et qu'elle n'est donc pas impliquée dans l'exocytose régulée par le calcium dans les cellules endocrines.



## **RÉSULTATS-PARTIE III**

*Distinct roles of the C<sub>2</sub>A and the C<sub>2</sub>B domain of the vesicular Ca<sup>2+</sup> sensor synaptotagmin 9 in endocrine  $\beta$ -cells*

*Florence Grise, Nada Taib, Carole Monerrat, Valérie Lagrée and Jochen Lang*

*En revision au près de *Biochemical Journal**



## Introduction

Dans les cellules insulino-sécrétoires, Syt 1, Syt 2 et Syt 9 ont été impliqués dans la libération de l'insuline régulée par le calcium (Gut et al., 2001; Iezzi et al., 2005a; Lang et al., 1997a). Syt 9 présente une forte homologie de séquence avec Syt 1 et donc plusieurs études ont recherché les caractéristiques *in vitro* de liaison de Syt 9 aux protéines SNARE et aux phospholipides membranaires. Des résultats divergents ont été publiés sur la capacité du domaine C2B de Syt 9 à lier les phospholipides en présence de calcium (Shin et al., 2004; Tucker et al., 2003). Certaines études ont montré une interaction dépendante du calcium entre le domaine C2B de Syt 9 et les phospholipides. D'autres études suggèrent que le domaine C2B n'a pas la capacité de lier les phospholipides *in vitro* bien que le domaine C2B de Syt 1 qui présente 96 % d'homologie avec celui de Syt 9 peut se lier en présence de calcium. Les résultats divergents sur les capacités du domaine C2B de Syt 9 à interagir avec d'autres constituants, proviennent d'un comportement particulier des protéines Syt recombinantes qui ont tendance à se lier fortement à des contaminants bactériens, ce qui gêne l'analyse des interactions *in vitro*.

De plus, aucune donnée concernant la liaison de Syt 9 aux protéines du complexe de fusion (protéines SNARE) n'a été mise en évidence *in vivo* (Bhalla et al., 2005; Shin et al., 2004; Tucker et al., 2003), ce qui suggère également un comportement distinct de Syt 9 par rapport à Syt 1.

Ces propriétés biochimiques (liaisons aux phospholipides et aux protéines SNARE) semblent pourtant nécessaires pour la fonction de senseur calcique de l'exocytose. Dans cette étude, nous avons donc étudié *in vivo*, les propriétés spécifiques de liaison aux membranes de Syt 9 et de ses domaines C2. Dans un deuxième temps, nous avons observé l'effet des mutations des domaines C2 dans la liaison de Syt 9 aux membranes et ainsi, nous avons observé des rôles distincts pour les deux domaines C2 dans les cellules insulino-sécrétoires.

Dans cette étude, nous avons généré des constructions de Syt 9 fusionnées à la GFP (*Green fluorescent protein*) afin de déterminer *in vivo* la dépendance calcique des liaisons des domaines C2 aux membranes.

**Title Page**

**Distinct roles of the C<sub>2</sub>A and the C<sub>2</sub>B domain of the vesicular Ca<sup>2+</sup> sensor synaptotagmin 9 in endocrine β-cells**

Florence Grise<sup>\*</sup>, Nada Taib<sup>+</sup>, Carole Monterrat<sup>\*</sup>, Valérie Lagrée<sup>\*</sup> and Jochen Lang<sup>\*</sup>

Jeune Equipe 2390<sup>\*</sup> et UMR 5144 CNRS Mobios<sup>+</sup>, Institut Européen de Chimie et Biologie, 2 Av. Robert Escarpit, F-33607 Pessac, France

Address correspondence to:

J. Lang, Tel. +33 540 00 3349; Fax +33 540 00 3348; e-mail [j.lang@iecb.u-bordeaux.fr](mailto:j.lang@iecb.u-bordeaux.fr)

**Running title:** Roles of synaptotagmin 9 C2A and C2B domain

**Key Words:** Ca<sup>2+</sup>, translocation, membranes, secretory granules, exocytosis



## Synopsis

Synaptotagmins form a family of calcium-sensor proteins implicated in exocytosis and these vesicular transmembrane proteins are endowed with two cytosolic calcium-binding C2 domains, C<sub>2</sub>A and C<sub>2</sub>B. Whereas the isoforms syt1 and 2 have been studied in detail, less is known on syt9, the calcium sensor of endocrine secretion such as insulin release from large dense core vesicles in pancreatic  $\beta$ -cells. Using cell based assays to closely mimic physiological conditions, we observed SNARE-independent translocation of syt9C<sub>2</sub>AB to the plasma membrane at calcium levels corresponding to endocrine exocytosis and followed by internalisation to endosomes. The use of point mutants and truncations revealed that initial translocation required only the C<sub>2</sub>A domain, whereas the C<sub>2</sub>B domain ensured partial pre-binding of syt9C<sub>2</sub>AB to the membrane and post-stimulatory localisation to endosomes. In contrast to the known properties of neuronal and neuroendocrine syt1 or syt2, the C<sub>2</sub>B domain of syt9 did not undergo calcium-dependent membrane binding despite a high degree of structural homology as observed through molecular modelling. These studies demonstrate distinct intracellular properties of syt9 with different roles for each C2 domain in endocrine cells.

## Introduction

Insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells proceeds by exocytosis of large dense core vesicles and  $\text{Ca}^{2+}$  constitutes the final trigger for fusion of vesicle and plasma membrane [1, 2]. Synaptotagmins (syt) have been identified as a major  $\text{Ca}^{2+}$  sensor in neuronal exocytosis based on genetic, electrophysiological and biochemical evidences [3, 4]. They form a family of transmembrane proteins containing two cytosolic C2 domains, C<sub>2</sub>A and C<sub>2</sub>B [3, 4]. The most studied synaptotagmins, syt1 and 2, bind phospholipids and SNARE proteins in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependant fashion via the C<sub>2</sub>-domains and thereby attach to lipid membranes and protein complexes involved in exocytosis [4]. In reconstituted systems this mechanisms seems to be instrumental for membrane fusion [5]. In addition to their interaction with exocytotic proteins, synaptotagmins may also intervene in endocytosis as suggested in early reports [6]. They are indeed known to interact with several components required for endocytosis [7-9]. Certain observations suggest that this may be mediated by the second C<sub>2</sub>-domain, C<sub>2</sub>B, although it is probably not its sole function [10-12].

The 16 synaptotagmins currently known can be classified according to their biochemical properties and by sequence alignment [13].  $\text{Ca}^{2+}$ -dependant phospholipid binding has been reported for syt1, 2, 3, 5, 7 and 9 [14] and these isoforms have been implicated in the regulation of membrane fusion in different models. In insulin-secreting cells the use of dominant-negative mutants, recombinant proteins and knock-downs has demonstrated a role for syt1, syt2 and syt9, the latter being the only isoform expressed in primary  $\beta$ -cells [15-17]. Syt9 represents a close homologue to syt1 on sequence alignments with a homology of 87% (C<sub>2</sub>A) and 96% (C<sub>2</sub>B), although its structure has not yet been reported. Whereas the kinetics of membrane translocation in the case of syt9 are compatible with endocrine exocytosis, the  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitivity of the cytosolic C<sub>2</sub>AB domains is not easy to reconcile [18-20]. In addition, divergent results have been published concerning the ability of the syt9 domains and especially the C<sub>2</sub>B domain, to interact with phospholipids and SNARE proteins [21, 22].

In view of the importance of syt9 as an endocrine  $\text{Ca}^{2+}$  sensor for the exocytosis of LDCVs, we have addressed its translocation and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependency as well as the role of the two C2 domains herein. We have used cell based assays employing transient expression and fluorescence or biochemical characterisation. This allows also to determine the site of translocation and to circumvent problems inherent to recombinant synaptotagmins [23, 24]. We now report  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent translocation of C<sub>2</sub>AB with an EC<sub>50</sub> compatible with endocrine secretion and solely supported by the C<sub>2</sub>A domain. In contrast, the C<sub>2</sub>B domain

impeded translocation but was required for subsequent localisation of C<sub>2</sub>AB to endocytotic structures.

## Materials and methods

### Antibodies

The following antibodies were employed: mab anti-T<sub>f</sub>R (H 684, Sigma), mab anti-synaptotagmin2, mab anti-synaptotagmin 9 (BD Biosciences, Le-Pont-de-Claix, France), anti-syntaxin (clone HPC1, Sigma, S<sup>t</sup> Louis, Missouri, USA), anti-βactin (Abcam, Cambridge, UK), polyclonal anti-eGFP (SantaCruz Biotechnologies, Heidelberg, FRG) and anti-SNAP25 (Sternberger Monoclonals, Covance Research Products, Berkeley USA); antibodies against chromogranin A, insulin, VAMP2 and synaptophysin were as described [25, 26]. HRP-linked anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies were purchased from Amersham Biosciences (Saclay, France); Cy3-labelled anti-mouse secondary antibody was obtained from Jackson ImmunoResearch (Soham, UK).

### Plasmids

The plasmid peGFP-Rab7 was kindly provided by B.van Deurs (Panum Institute, Copenhagen), peGFP-CD63 by G. Griffiths (Cambridge University), peGFP-Phogrin by W. Almers (Oregon Health Science University, Portland USA), BONT/C and BOTN/E by H. Niemann, H and T. Binz, (MHH Hannover, FRG) and peGFP-PKC by C. Larsson (University of Lund, Sweden). The vector pRSET-BmStrawberry was generously donated by R. Tsien (Shaner et al., 2004). The plasmid pKS-Syt2 was as described [15].

### Plasmid construction and mutagenesis

cDNA encoding mouse Syt 9 was generated by RT-PCR from total brain RNA and inserted in a pGEMT-T cloning vector. Truncated syt2 or syt0 was generated by PCR from pGEMT-syt9 or pKS-syt2 plasmids, respectively, using the corresponding sense and antisense primers with an EcoR<sub>I</sub> site (underlined) inserted in the forward primer and a BamH<sub>I</sub> in the reverse primer. Primers were as follows: Syt9 C<sub>2</sub>AB (amino acids 77 to 386), sense primer 5'-TTGGAATTCATGCTGGGCCGGAGTTACATAG-3', antisense primer 5'-TCTGGATCCTCCGGGTGCAGGTATTGGCC-3'; syt9 C<sub>2</sub>A (77-233): sense primer 5'-TTGGAATTCATGCTGGGCCGGAGTTACATAG-3', antisense primer 5'-TCTGGATCCAGCCACCTGCAGCTCTCTC-3'; syt9 C<sub>2</sub>B (215 - 386): sense primer 5'-TTGGAATTCATGAGTTCAGTGAACCTGG-3', antisense primer: 5'-

TCTGGATCCTCCGGGTGCAGGTATTGGCC-3', syt2 C2AB (101-422): sense primer: 5'-TTGGAATTCATGAAGGGCAAAGGCATGAAG-3', antisense primer: 5'-AGTGGATCCTTGTCTTGCCAGAAAGAG-3'. The amplified coding sequences were inserted in the EcoR<sub>I</sub>/BamH<sub>I</sub> cloning sites either of pEGFPN3 (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA) for syt9 or in the EcoR<sub>I</sub>/BamH<sub>I</sub> cloning sites of pEGFPN1 for Syt9. C<sub>2</sub>AB-mStrawberry was constructed by PCR amplification of syt9 C<sub>2</sub>AB using the primers pairs 5'-CCCAAGCTTATGCTGGGCCGGAGTTACATAG-3'; 5'-

TCTGGATCCGGTCCGGGTGCAGGTATTGGCC-3', Hind<sub>III</sub> and BamH<sub>I</sub> sites are underlined. After digestion with Hind<sub>III</sub>/BamH<sub>I</sub>, the amplicon was inserted in-frame into pCDNA<sub>3</sub>-mStrawberry. The pCDNA<sub>3</sub>-mStrawberry vector was constructed by insertion of the mStrawberry coding sequence into the restriction sites for BamHI and EcoRI of pcDNA3. All constructs were verified by sequencing of both strands. Point mutations were introduced into the syt9 coding sequence leading to the substitution of an aspartic acid (D) to an asparagine (N) using a Quickchange site directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The forward primers corresponding to each mutation were as follows (exchanged nucleotides given in bold) D145N: 5'-CCTAGGAGGTTCCCTCAAATCCCTATGTTAGTGTCT-3'; D197, 199N: 5'-GGTCATGGCGGTGTATAACTTTAATCGGTTCTCCCGCAACG-3'; D330, 332N: 5'-CTGACTGTTCTGAATTATAACAAACTGGGGAAGAATGAG-3'.

#### Cell culture, transient transfection and biochemical membrane translocation assay

MIN6 cells (passage 21 to 30) and HIT-T15 cells (passage (75 to 85) were cultured as described [25, 27]; 72h after plating, MIN6 and HIT-T15 cells were transfected according to manufacturer's instructions, with plasmids using Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 (Invitrogen) or JetPEI<sup>TM</sup> (PolyPlus-Transfection, Illkirch, France) respectively. HIT-T15 cells seeded at 5x10<sup>4</sup> cells/ml 72h prior transfection were grown in 24 well dishes and transfected with plasmid encoding for different cytosolic syt 9 fusion proteins. 72 hours after transfection, cells were washed with PBS pH 7.4, detached by PBS-EDTA 10mM and centrifuged at 3000g for 5 minutes at 4°C. Pelleted cells were resuspended and incubated in intracellular buffer (140mM L-glutamic acid/monopotassium salt, 5mM NaCl, 7mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM HEPES, pH 7, 1µg/ml Aprotinin, 1µg/ml Pepstatin, 1µg/ml Leupeptin, 0.5mM PMSF) either containing 2mM EGTA (non stimulating conditions/absence of Ca<sup>2+</sup>) or 2mM CaCl<sub>2</sub> with 10µM ionomycin (stimulating condition/presence of Ca<sup>2+</sup>) during 5 minutes at 37° C. Cells were

then disrupted by sonication by pulses of 10 second during 1 minute at 4°C [25, 27]. The cell debris and the nuclei were eliminated by a 10 minutes centrifugation at 500g, 4°C. Supernatants were centrifuged at 100 000g during 1 hour 4°C to separate the membrane and the cytosolic fraction. The corresponding samples were suspended in Laemmli buffer, heated at 95°C for 5 minutes and resolved on a 10%SDS-PAGE gel. Proteins were electroblotted onto PVDF, stained, blocked and incubated with the appropriate antibodies [25, 27]. The signal obtained with the chemiluminescence kit ECL Lumi-Light<sup>Plus</sup> Western Blotting Substrate (Roche Diagnostics, Meylan, France) was detected by a CCD-camera (Roperts Scientific, East Syracuse, NY, USA) and quantified with FluorChem v 2.00 (Alpha Innotech Corp., San Leandro, USA) [25, 27].

#### In vivo membrane translocation assay

MIN6 cells ( $1 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup>) grown on 25 mm round glass coverslips were washed twice with 1ml Krebs-Ringer buffer (KRB) pH 7.4 supplemented with 0.05% BSA and 3 mM glucose at 37°C (Boal et al., 2004a). In experiments using digitonin, cells were incubated in intracellular buffer supplemented with EGTA (0.4mM) and then stimulated in the same buffer with defined Ca<sup>2+</sup> concentration in presence of 30µM Digitonin. Buffered Ca<sup>2+</sup> solutions were obtained as described [25, 27] or, in the case of concentrations above 10µM of free Ca<sup>2+</sup>, calculated using Winmaxc (<http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html>) using NTA and HEDTA [28]. When ionomycin was used, cells were first incubated in Krebs-Ringer buffer (KRB) pH 7.4 supplemented with 0.05% BSA and 3 mM glucose and stimulation was performed with 1mM Ca<sup>2+</sup> and 10µM ionomycin in KRB. Cells were kept on a heated microscope stage during acquisition as described (Lajus et al., 2006; Monterrat et al., 2006). The stimulating buffer were pressure ejected (3 psi, 10s) from a micropipette held at approximately 20µm from the cell. Imaging of living cell was performed at 1 frame/0.5 s using an inverted microscope (Nikon TD300 equipped with a Z-drive) coupled to a monochromator (Till Photonics) and appropriate emission filters. Images were recorded by a CCD-camera (Micromax 1300Y HS, Roperts Scientific) using Metamorph software (Universal Imaging) [29].

### Fluorescence microscopy of fixed cells

MIN6 cells seeded at ( $2,6 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) were grown on 12-mm round glass coverslips and transfected with the corresponding plasmid. 72h after transfection, cells were washed twice with KRB and exposed to either KRB (non stimulating condition) or KRB containing 5mM Ca<sup>2+</sup> and 10 $\mu$ M ionomycin (stimulating condition) during 10 min at room temperature. Cells were then fixed for 20 minutes at room temperature in 4% paraformaldehyde/PBS in the absence (non stimulating condition) or presence of 5mM CaCl<sub>2</sub> (stimulating condition). Coverslips were either directly mounted or stained first with antibodies. In the latter case, coverslips were washed once with KRB and three times with PBS-2% BSA. Permeabilization was performed with 0.1% saponin in PBS-2%BSA for 30 minutes at room temperature and cells were stained with corresponding antibodies. Coverslips were mounted using an antifade kit (VECTASHIELD<sup>®</sup> Mounting Medium, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Imaging was performed on a LMS 510 Meta confocal laser microscope (Zeiss). Protein's Colocalisation of antibody staining was quantified using Metamorph software (Universal Imaging) by analysing localization and intensities of pixels (n=3) after thresholding. Values are given as mean +/- SEM.

### Molecular modeling

Simulations were carried out for following systems: 1) domain C<sub>2</sub>B of synaptotagmin 1 (NM001033680, amino acids 272-421 for modelling) [30] with 12323 water molecules plus 5 Cl<sup>-</sup> ions, giving a total of 3 8544 atoms in an initial box size of 7.37 . 7.37 . 7.37 nm<sup>3</sup>. 2) C<sub>2</sub>B domain of synaptotagmin 9 (NM016908, amino acids 239-386) with 10967 water molecules plus 12 Cl<sup>-</sup> ions giving a total of 34388 atoms in initial box size of 7.06 – 7.06 – 7.06 nm<sup>3</sup>. These systems were solvated with SPC (simple point charge) water and energy minimised. Molecular dynamics simulations were run using Gromacs [31]. A twin-range cut-off was used for longer range interactions: 1nm for Van der Waals interactions and 1.8 for electrostatic interactions. The time step was 2 fs using Shake and to constrain bond lengths NPT conditions were used (i.e., constant number of particles, pressure and temperature in the simulation). A constant pressure of 1 bar in all three directions with a coupling constant of  $\tau_p = 1 ps$  [32]. Water and protein were coupled separately to a temperature bath at 300 K, with a coupling constant  $\tau_T = 0.1 ps$ . The system was equilibrated for 2ns and simulation run for another ns. Results were depicted as ribbon diagrams using VMD 1.8.4 (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>).

### Statistical analyses

For comparison of two groups, the student's  $t$ -test was used.



## Results

*Biochemical characterisation of syt9C<sub>2</sub> domains in situ* - In our attempt to investigate the behaviour and translocation of the cytosolic domain of synaptotagmin 9 we have generated constructs and mutants encompassing the C<sub>2</sub>A and the C<sub>2</sub>B domain (see Fig. 1) and compared it to syt2 C<sub>2</sub>AB. All constructs harboured a fluorescent protein at their C-terminus, either eGFP or strawberry. Moreover, point mutations were introduced in the Ca<sup>2+</sup>-binding sites. Indeed, replacement of cognate aspartates by asparagines in the C<sub>2</sub>A domain of synaptotagmin 1 has been shown to abolish partially (D145, numbering for syt9) or completely (D197/199 in syt9) Ca<sup>2+</sup>-mediated effects of this domain [15, 33]. Similarly, a double mutation in the Ca<sup>2+</sup>-binding site of the C<sub>2</sub>B domain of syt1 (corresponding to D330/D332 of syt9) completely abolishes its function in-vivo [12]. The encoded proteins were expressed in insulin-secreting cells (Fig. 1B) as demonstrated by the use of antibodies against syt9, which also recognized the endogenous forms (left and middle panel), except for Syt9C<sub>2</sub>B. The protein expressed by this construct did no longer contain the antigenic epitope for the anti-syt9 antibody, but still reacted with anti-eGFP (Fig. 1B, right panel).

We subsequently used these constructs to examine the translocation of syt9 first in a biochemical approach to characterize the behaviour of syt9C<sub>2</sub>AB. To this end cells were incubated in the absence or presence of Ca<sup>2+</sup> (2mM) and ionomycin prior to their fractionation in supernatants (cytosol) and membrane pellets. As shown in Fig. 2, a considerable amount of Syt9C<sub>2</sub>AB is already present at membranes in the absence of Ca<sup>2+</sup> and the cation induces a complete shift of syt9C<sub>2</sub>AB to the membrane fraction. Membrane binding of Syt9C<sub>2</sub>AB is sensitive to a high concentration of salt (Fig. 2B) indicating the electrostatic nature of the interaction. Ca<sup>2+</sup>-sensitive synaptotagmins bind to the membrane SNARE proteins such as syntaxin or SNAP-25 in a Ca<sup>2+</sup>-sensitive manner and this interaction is sensitive to the action of clostridial neurotoxins [34, 35]. To test whether these SNARE proteins are involved in the translocation observed here, we coexpressed Syt9C<sub>2</sub>AB and botulinum neurotoxin E or C1 prior to analysis. Neither of the two toxins altered the Ca<sup>2+</sup>-sensitive distribution of Syt9C<sub>2</sub>AB despite cleavage of syntaxin 1 and SNAP25 (Fig. 2C). Note that cleavage was not complete as transient transfection will lead to expression only in a fraction of cells. Taken together these data demonstrate that Syt9C<sub>2</sub>AB translocates to membranes in response to Ca<sup>2+</sup> in these insulin-secreting cells. This event occurred independent from SNARE proteins and most likely implies ionic interactions with membrane phospholipids.

We addressed next the role of the different domains of Syt9C<sub>2</sub>AB in translocation by biochemical means and compared first the C<sub>2</sub> domain of protein kinase C (PKC) with the C<sub>2</sub>AB domain of synaptotagmin 2 and 9 (Fig. 3A). Interestingly both, PKC-C<sub>2</sub> and syt2C<sub>2</sub>AB, did not bind to membranes in absence of Ca<sup>2+</sup> in contrast to syt9C<sub>2</sub>AB. As expected, a rise in Ca<sup>2+</sup> resulted in a complete translocation for all three constructs. The first C<sub>2</sub> domain of syt9 alone, syt9C<sub>2</sub>A, was largely cytosolic in the absence of Ca<sup>2+</sup> and fully translocated. It thus behaved as syt2C<sub>2</sub>AB and PKC-C<sub>2</sub>. Note that a double band was observed as syt9C<sub>2</sub>A (arrow) migrated just below endogenous syt9 and both were stained by the antibody used. In contrast to the C<sub>2</sub>A domain, the C<sub>2</sub>B domain remained mainly cytosolic despite the increase in Ca<sup>2+</sup>. Mutation of D<sub>145</sub> to asparagines in syt9C<sub>2</sub>AB did not alter the translocation, whereas mutation of D<sub>197</sub> and D<sub>199</sub> rendered syt9C<sub>2</sub>AB Ca<sup>2+</sup> insensitive (Fig. 3C). We also tested the role of the aspartates in the second C<sub>2</sub> domain known to be required for Ca<sup>2+</sup> coordination in syt1 and its function in neuroendocytosis [12]. Contrary to the mutations in syt9C<sub>2</sub>A, these mutations in the second C<sub>2</sub> domain did not influence the Ca<sup>2+</sup>-induced distribution of syt9C<sub>2</sub>AB. However, syt9C<sub>2</sub>AB<sub>D330,332N</sub> exhibited a considerable increase in membrane binding in the absence of Ca<sup>2+</sup> similar to the reported observations on the cognate mutation in syt1C<sub>2</sub>AB [33].

*Modelisation of syt9C<sub>2</sub>B domain* - To get more insight into the differences between syt1 and syt9 we modelled the structure of syt9C<sub>2</sub>B using the published crystal structure of syt1C<sub>2</sub>B as a template and performed molecular dynamics simulation after equilibration of the system (Fig. 4). The syt9 sequence showed a striking overall resemblance to syt1 though some differences were apparent. The main distinction concerned the  $\beta$ -sheets 3 and 4 (Fig. 4, arrow) which were partially or completely absent in syt9C<sub>2</sub>B. Sheet 4 contains seven lysines, which are generally unfavourable for  $\beta$ -sheet formation and modelling has probably failed for this reason to detect the sheets documented previously by NMR and crystallography [30, 36]. As a control, we had modelled syt1C<sub>2</sub>B alongside with syt9C<sub>2</sub>B and again, both  $\beta$ -sheets partially unfolded or were absent (data not shown). The sole additional, albeit minor difference concerned the C-terminal acidic  $\alpha$ -helix H2, which was shorter in syt9C<sub>2</sub>B. In contrast, the main Ca<sup>2+</sup> coordination sites were well conserved and no difference was seen in the spatial arrangement around  $\beta$ -sheets 6 and 7, from which they emerge. Actually exchange of this portion in syt9C<sub>2</sub>B by the corresponding sequence of syt1C<sub>2</sub>B conferred “syt1-like” biochemical properties to the mutated syt9C<sub>2</sub>B. Thus differences in spatial arrangement do not seem to be responsible for the particular behaviour of syt9C<sub>2</sub>B.

*Translocation of syt9C<sub>2</sub> domains in living cells* - These biochemical assays suggest that the C<sub>2</sub>B domain does not positively influence translocation of syt9C<sub>2</sub>AB but rather impedes it. However, this approach does not allow determining the nature of the membrane(s) syt9 is binding to and may be influenced by the lengthy fractionation protocol. We therefore resorted to the observation of membrane translocation in living cells by the use of fluorescent videomicroscopy. Moreover, we combined this approach with the use of a detergent, digitonin, to permeabilize the membrane and the use of defined Ca<sup>2+</sup> buffers to equilibrate intracellular concentrations of the cation [26, 37]. A typical experiment is given in Figure 5A depicting the translocation observed for syt9C<sub>2</sub>A and syt9C<sub>2</sub>AB. Note that some cytosolic fluorescence is still visible which represents out of focus imaging of plasma membranes in these rather flat cells with a height of 8 to 10 µm. In addition we observed nuclear staining which, according to the immunoblots, represents full-length synaptotagmin. Syt2C<sub>2</sub>AB and syt9C<sub>2</sub>AB exhibited distinct Ca<sup>2+</sup> sensitivities EC<sub>50</sub>s at around 1 µM and 10 µM of free Ca<sup>2+</sup>, respectively. In contrast, syt9C<sub>2</sub>A behaved as syt2C<sub>2</sub>AB in terms of Ca<sup>2+</sup> sensitivity in line with our observations in the biochemical assays (see above). Again syt9C<sub>2</sub>B remained purely cytosolic and no evidence could be found for translocation (Fig. 5B) and this even on close direct inspection during the experiment or by confocal microscopy (data not shown). This approach also revealed that Syt9C<sub>2</sub>AB carrying the mutation D<sub>145</sub>N exhibited some degree of translocation but only at millimolar concentration of free Ca<sup>2+</sup>, whereas translocation was completely abolished by the double mutation D<sub>197</sub>N/D<sub>199</sub>N. Again, the mutation D<sub>330</sub>N/D<sub>332</sub>N in the C<sub>2</sub>B domain did not alter the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of syt9C<sub>2</sub>AB. Thus in both, the biochemical and the in-vivo approaches, the C<sub>2</sub>B domain of syt9 actually reduced the Ca<sup>2+</sup>-sensitivity and the extent of translocation.

*Syt9C<sub>2</sub>B is required for late translocation to endosomes* - On close inspection of films it became apparent that syt9C<sub>2</sub>AB rapidly detached from the membrane once the perfusion with buffers containing elevated Ca<sup>2+</sup> was stopped and translocated to granular intracellular structures. However, as the detergent digitonin permeabilized the plasma membrane, a large amount of syt9C<sub>2</sub>AB leaked out of the cell rendering imaging of those structures difficult. We therefore used ionomycin and Ca<sup>2+</sup> as a stimulus to improve visualisation of these structures (Fig. 6A to D). At about 5 s after beginning of membrane translocation staining of these structures became apparent. Most interestingly, the D<sub>330</sub>N/D<sub>332</sub>N mutant of syt9C<sub>2</sub>AB translocated to the membrane, but never moved subsequently to intracellular structures thus

indicating a role for the C<sub>2</sub>B domain in the second step. Syt9C<sub>2</sub>B alone never translocated and both mutants of the C<sub>2</sub>A Ca<sup>2+</sup>-binding site (syt9C<sub>2</sub>AB D<sub>145</sub>N and D<sub>330,332</sub>N) failed to translocate to the plasma membrane under the conditions used here (intact cells, ionomycin) and were not found on intracellular structures (data not shown). It seems therefore that prior passage to the plasma membrane is required for localisation on the intracellular structures.

In view of the requirement of the C<sub>2</sub>B domain for this event we attempted to characterize the compartment(s) involved by coexpression of fluorescent fusion proteins and the use of antibodies. As the fusion proteins used as marker were tagged with eGFP, we used syt9C<sub>2</sub>AB linked to the fluorescent protein (FP) strawberry, which behaved as syt9C<sub>2</sub>AB-eGFP and colocalized with eGFP tagged syt9 upon cotransfection (data not shown). To exclude a potential interaction between fluorescent proteins, we tested the combination of syt9C<sub>2</sub>AB-FP and LPH-eGFP, a plasma membrane marker [27] and SVP38-eGFP [38]. Neither of these constructs colocalized with syt9C<sub>2</sub>AB-strawberry suggesting that interactions between FPs did not play any significant role (data not shown). A considerable number of compartments tested using antibodies did also not reveal any substantial degree of colocalisation such as SNAP-25, syntaxin 1, VAMP2/synaptobrevin2, insulin and chromogranin A excluding SNARE proteins or secretory granules as localisation for syt9C<sub>2</sub>AB-eGFP. In contrast, we observed a high degree of colocalisation for the endosomal markers CD63-eGFP [39] and rab7-eGFP [40] (see Fig. 6). In addition, colocalisation was evident for phogrin-eGFP [41], known to be recycled through endosomal pathways, and to a lesser degree for the transferrin receptor. These observations are in line with an attachment of syt9C<sub>2</sub>AB to endosomal membranes.

## Discussion

Synaptotagmins play a major role as  $\text{Ca}^{2+}$  sensor in exocytotic membrane fusion and in endocytosis [42, 43]. Despite a considerable conservation in the  $\text{Ca}^{2+}$  and phospholipid-binding  $\text{C}_2$  domains among several isoforms, such as syt1, 2 and 9, differences are apparent which may be of functional importance. Our data indicate that the  $\text{C}_2\text{AB}$  domain of synaptotagmin 9 is operational in living cells at  $\text{Ca}^{2+}$  levels present during exocytosis in pancreatic  $\beta$ -cells [20, 44]. In contrast to syt1, however, the  $\text{C}_2\text{B}$  domain lowers the  $\text{Ca}^{2+}$ -affinity for membrane translocation, but is required for ensuing localisation on endosomal structures.

In contrast to previous studies, we used transient expression of synaptotagmins in mammalian cells for our biochemical and fluorescent assays. Although liposomal systems permit a good control of the variables, they do not reproduce the lipid composition or membrane protein/lipid ratio present in native preparations as glycerophospholipids are largely overrepresented. It is thus important to obtain affinities at intracellular conditions. Moreover, the use of recombinant synaptotagmins has been difficult due to precipitation [45, 46] or the presence of bacterial contaminants [23, 24]. Our initial biochemical characterization revealed that the interactions are sensitive to ionic forces and can occur independently from SNARE proteins. Indeed, their cleavage by clostridial neurotoxins did not alter the distribution or extent of translocation. Note that divergent results on  $\text{Ca}^{2+}$ -dependant binding of syt9 $\text{C}_2\text{AB}$  to SNARE proteins had been reported [18, 22]. Our observation does not exclude a role for the interaction with SNARE proteins in the membrane attachment of syt9, as they may direct synaptotagmins to specific sites, or in the function of syt9 during membrane fusion, which was not tested here.

Two major differences were apparent here when comparing the  $\text{C}_2\text{AB}$  domains of syt9 and syt2. First, in both assays syt9 $\text{C}_2\text{AB}$  was already in part attached to the membrane at 0.1  $\mu\text{M}$  or the absence free  $\text{Ca}^{2+}$ , whereas syt2 $\text{C}_2\text{AB}$  was completely cytosolic under those conditions. The differential membrane attachment of the two isoforms in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  has been inconsistently observed in certain liposome-based assays using phosphatidylcholine/phosphatidylserine vesicles and was more pronounced in the presence of  $\text{PIP}_2$  [21, 22]. Cleavage of SNARE proteins by clostridial neurotoxins did not diminish the attachment in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  in our assays. Interestingly, neither syt9 $\text{C}_2\text{A}$  alone nor syt9 $\text{C}_2\text{B}$  alone demonstrated any membrane binding in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$ . Pre-binding of syt9 $\text{C}_2\text{AB}$  to membranes is therefore independent of SNARE proteins and requires

cooperation between the two C<sub>2</sub> domains. Second, the EC<sub>50</sub> for Ca<sup>2+</sup> required in membrane translocation differed by one order of magnitude between syt2C<sub>2</sub>AB and syt9C<sub>2</sub>AB. Interestingly, syt9C<sub>2</sub>A alone was indistinguishable from syt2C<sub>2</sub>AB in this term. The most likely explanation is provided by the increased pre-binding of syt9 in presence of the C<sub>2</sub>B domain which abolishes a high affinity component. Importantly, the EC<sub>50</sub> observed here for syt9C<sub>2</sub>AB in living cells corresponds well with the values reported for Ca<sup>2+</sup> evoked exocytosis of insulin [20, 44].

Whereas the C<sub>2</sub>A domains of syt9 behaved as expected, the C<sub>2</sub>B domain clearly differed from syt2C<sub>2</sub>B in respect to reported Ca<sup>2+</sup>-dependent membrane binding [21, 47]. As to the C<sub>2</sub>B domain divergent results have been reported using either the C<sub>2</sub>B domain only [22] or a C<sub>2</sub>B domain containing in addition 23 amino acids of the sequence linking C<sub>2</sub>A and C<sub>2</sub>B [21]. Our modelling data support the notion that amino acids 238 to 386 are sufficient to form a stable C<sub>2</sub>B domain and additional N-terminal residues are not required. The observations reported here clearly indicate that syt9C<sub>2</sub>B is not capable to translocate in the cellular environment. This difference is surprising in view of the high degree of sequence conservation as well as structural arrangement between the isoforms. As membrane attachment of syt1C<sub>2</sub>B is less resistant to salt washes than syt1C<sub>2</sub>A, minor changes in the C<sub>2</sub>B domain may be important [48]. Indeed, domain swapping between syt1 and syt9 around loop 3 restored Ca<sup>2+</sup> sensitivity [22]. As the structure of this sequence part is conserved between the two isoforms in modelling, very subtle changes may be responsible.

Although syt9C<sub>2</sub>B was fully dispensable for Ca<sup>2+</sup>-dependent membrane translocation, it was clearly required for the subsequent attachment to intracellular structures as syt9C<sub>2</sub>AB<sub>D330,332N</sub> still translocated to the plasma membrane, but was not internalized. Although syt9C<sub>2</sub>B does not bind Ca<sup>2+</sup> in accordance to indirect assays as performed here and by others [22], the mutation C<sub>2</sub>AB<sub>D330,332N</sub> is located at the base of a loop directed towards the membrane and may thus destabilize interactions [49]. Intracellular targeting of syt1C<sub>2</sub>A has been reported but was mainly directed to the trans-Golgi network in MDCK kidney cells in contrast to our observation on both C<sub>2</sub> domains of syt9 [50]. The reported localisation may reflect distinct affinities for certain phosphoinositols or SNARE proteins. The codistribution of marker proteins observed here for syt9C<sub>2</sub>AB is compatible with late endosomes as a major location and a minor location on early endosomes. Syt9 has been reported previously on endocytotic compartments in mast cells and syt9C<sub>2</sub>B interacts with the clathrin adaptor complex AP-2, as had been shown for other synaptotagmins [7, 51]. This provides a potential mechanism for internalisation. As targeting to the intracellular structures required the

presence of the C<sub>2</sub>A domain, we reckon prior contact with the plasma membrane is required and the fluorescent protein accompanies membrane internalisation, but is not directly transferred from the cytosol to endosomes. The functional implication is yet unclear in the case of syt9. The C<sub>2</sub>B domain of syt1 is implicated in the regulation of endocytosis and interestingly requires the Ca<sup>2+</sup>-coordinating aspartates in C<sub>2</sub>B cognate to those which abolished internalisation of syt9C<sub>2</sub>AB [52].

What might be the functional outcome of the differences between syt1 and syt9 in terms of C<sub>2</sub> domains? Whereas in clonal β-cells syt1, 2 and 9 are expressed on LDCVs and function in exocytosis, primary cells contain seemingly only syt9 and this isoform should therefore not be a redundant Ca<sup>2+</sup>-sensor [15-17, 53]. The Ca<sup>2+</sup> dependency of syt9C<sub>2</sub>AB fits well with the physiological Ca<sup>2+</sup> requirements for insulin exocytosis and the observed right shift may be compensated by pre-binding to the membrane via the C<sub>2</sub>B domain. Such a mechanism may be an advantage in a cell that secretes mainly at limited time periods, i.e. in response to nutritional stimuli.

## References

- 1 Henquin, J. C. (2004) *Diabetes* **53 Suppl 3**, S48-58
- 2 Lang, J. (1999) *Eur. J. Biochem.* **259**, 3-17
- 3 Sudhof, T. C. (2004) *Annu. Rev. Neurosci.* **27**, 509-547
- 4 Jahn, R., Lang, T. and Sudhof, T. C. (2003) *Cell* **112**, 519-533
- 5 Bhalla, A., Chicka, M. C., Tucker, W. C. and Chapman, E. R. (2006) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 323-330
- 6 DiAntonio, A., Parfitt, K. D. and Schwarz, T. L. (1993) *Cell* **73**, 1281-1290
- 7 Zhang, J. Z., Davletov, B. A., Sudhof, T. C. and Anderson, R. G. (1994) *Cell* **78**, 751-760
- 8 von Poser, C., Zhang, J. Z., Mineo, C., Ding, W., Ying, Y., Sudhof, T. C. and Anderson, R. G. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 30916-30924
- 9 Fergestad, T. and Broadie, K. (2001) *J. Neurosci.* **21**, 1218-1227
- 10 Llinas, R. R., Sugimori, M., Moran, K. A., Moreira, J. E. and Fukuda, M. (2004) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* **101**, 17855-17860
- 11 Earles, C. A., Bai, J., Wang, P. and Chapman, E. R. (2001) *J. Cell Biol.* **154**, 1117-1124
- 12 Mackler, J. M., Drummond, J. A., Loewen, C. A., Robinson, I. M. and Reist, N. E. (2002) *Nature* **418**, 340-384
- 13 Craxton, M. (2004) *BMC Genomics* **5**, 43
- 14 Rickman, C., Craxton, M., Osborne, S. and Davletov, B. (2004) *Biochem J* **378**, 681-686
- 15 Lang, J., Fukuda, M., Zhang, H., Mikoshiba, K. and Wollheim, C. B. (1997) *EMBO J.* **16**, 5837-5846
- 16 Gut, A., Kiraly, C. E., Fukuda, M., Mikoshiba, K., Wollheim, C. B. and Lang, J. (2001) *J. Cell Sci.* **114**, 1709-1716
- 17 Iezzi, M., Eliasson, L., Fukuda, M. and Wollheim, C. B. (2005) *FEBS Lett.* **579**, 5241-5246
- 18 Bhalla, A., Tucker, W. C. and Chapman, E. R. (2005) *Mol. Biol. Cell* **16**, 4755-4764
- 19 Rorsman, P., Eliasson, L., Renstrom, E., Gromada, J., Barg, S. and Gopel, S. (2000) *News Physiol. Sci.* **15**, 72-77
- 20 Vallar, L., Biden, T. J. and Wollheim, C. B. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 5049-5056
- 21 Tucker, W. C., Edwardson, J. M., Bai, J., Kim, H. J., Martin, T. F. and Chapman, E. R. (2003) *J. Cell Biol.* **162**, 199-209



- 22 Shin, O. H., Maximov, A., Lim, B. K., Rizo, J. and Sudhof, T. C. (2004) *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* **101**, 2554-2559
- 23 Shin, O. H., Rhee, J. S., Tang, J., Sugita, S., Rosenmund, C. and Sudhof, T. C. (2003) *Neuron* **37**, 99-108
- 24 Ubach, J., Lao, Y., Fernandez, I., Arac, D., Sudhof, T. C. and Rizo, J. (2001) *Biochemistry* **40**, 5854-5860
- 25 Monterrat, C., Boal, F., Grise, F., Hemar, A. and Lang, J. (2006) *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 73-81
- 26 Boal, F., Zhang, H., Tessier, C., Scotti, P. and Lang, J. (2004) *Biochemistry* **43**, 16212-16223
- 27 Lajus, S., Vacher, P., Huber, D., Dubois, M., Benassy, M. N., Ushkaryov, Y. and Lang, J. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 5522-5531
- 28 Patton, C., Thompson, S. and Epel, D. (2004) *Cell Calcium* **35**, 427-431
- 29 Lajus, S. and Lang, J. (2006) *J. Cell. Biochem.* EPub ahead of print
- 30 Cheng, Y., Sequeira, S. M., Malinina, L., Tereshko, V., Sollner, T. H. and Patel, D. J. (2004) *Protein Sci.* **13**, 2665-2672
- 31 van Aalten, D. M., Amadei, A., Linssen, A. B., Eijssink, V. G., Vriend, G. and Berendsen, H. J. (1995) *Proteins* **22**, 45-54
- 32 Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, A. and Haak, J. R. (1984) *J. Chem. Phys.* **81**, 3684-3690
- 33 Robinson, I. M., Ranjan, R. and Schwarz, T. L. (2002) *Nature* **418**, 336-340
- 34 Jahn, R. and Niemann, H. (1994) *Ann N Y Acad Sci* **733**, 245-55
- 35 Lang, J., Zhang, H., Vaidyanathan, V. V., Sadoul, K., Niemann, H. and Wollheim, C. B. (1997) *FEBS Lett.* **419**, 13-7
- 36 Fernandez, I., Arac, D., Ubach, J., Gerber, S. H., Shin, O., Gao, Y., Anderson, R. G., Sudhof, T. C. and Rizo, J. (2001) *Neuron* **32**, 1057-1069
- 37 Lang, J., Regazzi, R. and Wollheim, C. B. (1997) in *Bacterial toxins: tools in cell biology* (Aktories, K., ed.), pp. 217-240, Chapman & Hall, Weinheim
- 38 Kaether, C., Skehel, P. and Dotti, C. G. (2000) *Mol. Biol. Cell* **11**, 1213-1224
- 39 Kobayashi, T., Vischer, U. M., Rosnoblet, C., Lebrand, C., Lindsay, M., Parton, R. G., Kruihof, E. K. and Gruenberg, J. (2000) *Mol. Biol. Cell* **11**, 1829-1843
- 40 Vonderheit, A. and Helenius, A. (2005) *PLoS Biology* **3**, e233
- 41 Vo, Y. P., Hutton, J. C. and Angleson, J. K. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**, 1004-1010
- 42 Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R. E., Li, C., Rosahl, T. W., Stevens, C. F. and Sudhof, T. C. (1994) *Cell* **79**, 717-727

- 43 Nicholson-Tomishima, K. and Ryan, T. A. (2004) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA **101**, 16648-16652
- 44 Bokvist, K., Eliasson, L., Ammala, C., Renstrom, E. and Rorsman, P. (1995) EMBO J. **14**, 50-57
- 45 Damer, C. K. and Creutz, C. E. (1996) J. Neurochem. **67**, 1661-1668
- 46 Elferink, L. A., Peterson, M. R. and Scheller, R. H. (1993) Cell **72**, 153-159
- 47 Li, C., Ullrich, B., Zhang, J. Z., Anderson, R. G., Brose, N. and Sudhof, T. C. (1995) Nature **375**, 594-599
- 48 Hui, E., Bai, J. and Chapman, E. R. (2006) Biophys J. Epub ahead of print
- 49 Rufener, E., Frazier, A. A., Wieser, C. M., Hinderliter, A. and Cafiso, D. S. (2005) Biochemistry **44**, 18-28
- 50 Evans, J. H., Gerber, S. H., Murray, D. and Leslie, C. C. (2004) Mol. Biol. Cell **15**, 371-383
- 51 Haberman, Y., Ziv, I., Gorzalczany, Y., Fukuda, M. and Sagi-Eisenberg, R. (2005) J. Cell Sci. **118**, 1641-1649
- 52 Poskanzer, K. E., Fetter, R. D. and Davis, G. W. (2006) Neuron **50**, 49-62
- 53 Xiong, X., Zhou, K. M., Wu, Z. X. and Xu, T. (2006) Biochem. Biophys. Res. Commun. **347**, 76-82

## Figure Legends

**Fig. 1.** Expression of Syt2 and Syt9 constructs. (A) Schematic diagram representing the different syt9 and syt2 constructs used: Syt2 C<sub>2</sub>AB (101-422), Syt9 C<sub>2</sub>AB (77-386), Syt9 C<sub>2</sub>A (77-233) and Syt9 C<sub>2</sub>B (215-386). Mutation of aspartate to asparagine in the C<sub>2</sub>A and/or the C<sub>2</sub>B domains gave rise to D145N, D197N, D199N, D330N, D332N. All constructs are C-terminally tagged with a fluorescent protein (FP). (B) Expression of the constructs in HIT T15 cells. Cells were transfected with the different variants. 72h after transfection, cells were harvested and 20µg of total proteins were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-Syt2, anti-Syt9 (BD) or anti-eGFP antibodies. The lane number corresponds to the construct number.

**Fig. 2.** Membrane binding of Syt9 C<sub>2</sub>AB-eGFP in HIT-T15 cells. (A) 72h after transfection with Syt9 C<sub>2</sub>AB-EFP, HIT-T15 cells were incubated 5 min at 37°C in presence of Ca<sup>2+</sup> (2mM CaCl<sub>2</sub> supplemented with 10µM ionomycin) or in absence of Ca<sup>2+</sup> (2mM EGTA) and fractioned by ultracentrifugation at 100.000g. Distribution of Syt9 C<sub>2</sub>AB-eGFP in supernatants (c) and membrane pellets (m) were analyzed by western blot using antibodies against syt9 and against the transmembrane protein syntaxin 1 as a control for fractionation. The distribution was quantified by densitometry as given by the histogram (on the right), S.Ds are indicated (N=8). (B) Transfected cells are incubated in absence or in presence of Ca<sup>2+</sup> supplemented with 0.5M KCl. Fractionation and analysis was performed as above, N=3. (C) HIT-T15 cells were co-transfected with Syt9 C<sub>2</sub>AB-eGFP and plasmids coding for botulinum neurotoxins BoNT/C and BoNT/E. Translocation and the effect of each toxin were analysed by immunoblotting using anti-syt9, anti-syntaxin1 or anti-SNAP25 antibodies. Errors bars represent the s.d. (N=3); \*, 2p<0.05 as compared to membranes.

**Fig. 3.** The C<sub>2</sub>A but not the C<sub>2</sub>B domain is responsible of Ca<sup>2+</sup>-dependant binding of Syt9 to membranes. (A) HIT-T15 cells expressing PKC-C<sub>2</sub>α-eGFP, Syt2 C<sub>2</sub>AB-eGFP and Syt9 C<sub>2</sub>AB-eGFP were incubated 5min at 37°C in presence (2mM CaCl<sub>2</sub>, 10µM ionomycin) or absence of Ca<sup>2+</sup> (2mM EGTA). The subsequent fractionation was analysed by western blot using anti-GFP, anti-syt2 or anti-syt9 antibodies for PKC-C<sub>2</sub>α-eGFP, Syt2 C<sub>2</sub>AB-eGFP and

Syt9 C<sub>2</sub>AB-eGFP, respectively. Histograms on the right represent the distribution of the protein quantified by densitometry. Errors bars represent the S.D (n=3); \*, 2p<0.05 as compared to membranes. (B) The same experiments in (A) were performed on HIT-T15 cells transfected with syt9 C<sub>2</sub>A-eGFP and Syt9 C<sub>2</sub>B-eGFP. Syt9 C<sub>2</sub>A-eGFP, was revealed with the anti-syt9 antibody that detected the fluorescent protein (indicated by arrow) and the endogenous protein. Syt9 C<sub>2</sub>B-eGFP was revealed with the anti-GFP antibody as it does not contain the epitope for the anti-Syt9 antibody. (C) Syt9-C<sub>2</sub>AB-eGFP and its mutants were detected using anti-syt9.

**Fig. 4.** Molecular simulation of syt9 C<sub>2</sub>B domain. Ribbon diagrams are shown (magenta,  $\alpha$ -helices; yellow,  $\beta$ -sheets; green, loops) A: syt1 C<sub>2</sub>B according to crystal structure 1UOW. B: C<sub>2</sub>B domain of syt9 after 3 ns simulation. The loops 2 and 3 (L2, L3), the mutation D<sub>330</sub>N/D<sub>332</sub>N (asterisks) and the unstructured part corresponding to the  $\beta$ -sheet 4 in syt1 (arrowhead) are indicated. Views are given to high-lighten differences between the structures.

**Fig. 5:** Stimulation of living cells by low micromolar Ca<sup>2+</sup> translocates the C<sub>2</sub>A, but not the C<sub>2</sub>B domain of Syt9. (A) MIN6 cells expressing Syt9 C<sub>2</sub>AB-eGFP or Syt9 C<sub>2</sub>A-eGFP were grown on coverslip and stimulated by pressure ejection of buffer with buffer containing 10 $\mu$ M of free Ca<sup>2+</sup> supplemented with 10 $\mu$ M digitonin. Cells were imaged at 37° C by time-lapse microscopy. Images **a** and **c** were taken 0 sec and, **b** and **d** 3 sec after stimulation. (B) Membrane binding affinity of Syt9 variants. Experiments are performed in MIN6 cells as described in A. Defined concentrations of free Ca<sup>2+</sup> supplemented with digitonin were used to stimulate the cells.

**Fig. 6.** Syt9 C<sub>2</sub>AB-eGFP but not Syt9 C<sub>2</sub>AB D<sub>330/332</sub>N-eGFP distributes to intracellular structures after stimulation with Ca<sup>2+</sup>. MIN6 cells expressing Syt9 C<sub>2</sub>AB-eGFP (A, B, C) or Syt9 C<sub>2</sub>AB D<sub>330/332</sub>N -eGFP (E,F,G) were stimulated by 5mM CaCl<sub>2</sub> and 10 $\mu$ M ionomycin. The distribution of the two fusion proteins was imaged and the three panels represent the distribution of the proteins at 0 sec (A, E), 10 sec (B, F) and 20 sec after stimulation (C, G). GFP fluorescence was quantified in 2 different areas corresponding to plasma membrane (Zone 1) and to the intracellular space (Zone 2) (D, H). F<sub>0</sub>: fluorescence at t=0sec F<sub>t</sub>: fluorescence at t. Images are representative at least ten independent experiments.

**Fig. 7.** Syt9 C<sub>2</sub>AB redistributes to endosomes. MIN6 cells transfected with constructs indicated on the figure were incubated for 10 min at room temperature in presence of Ca<sup>2+</sup> (5mM CaCl<sub>2</sub>, ionomycin 10μM) to allow the translocation of syt9 C<sub>2</sub>AB-FP to the plasma membrane and to intracellular structure. Cells were subsequently fixed and colocalization of the FP constructs analysed by confocal microscopy. The percentage of colocalization is given obtained from at least five experiments.

## Figures

FIG 1

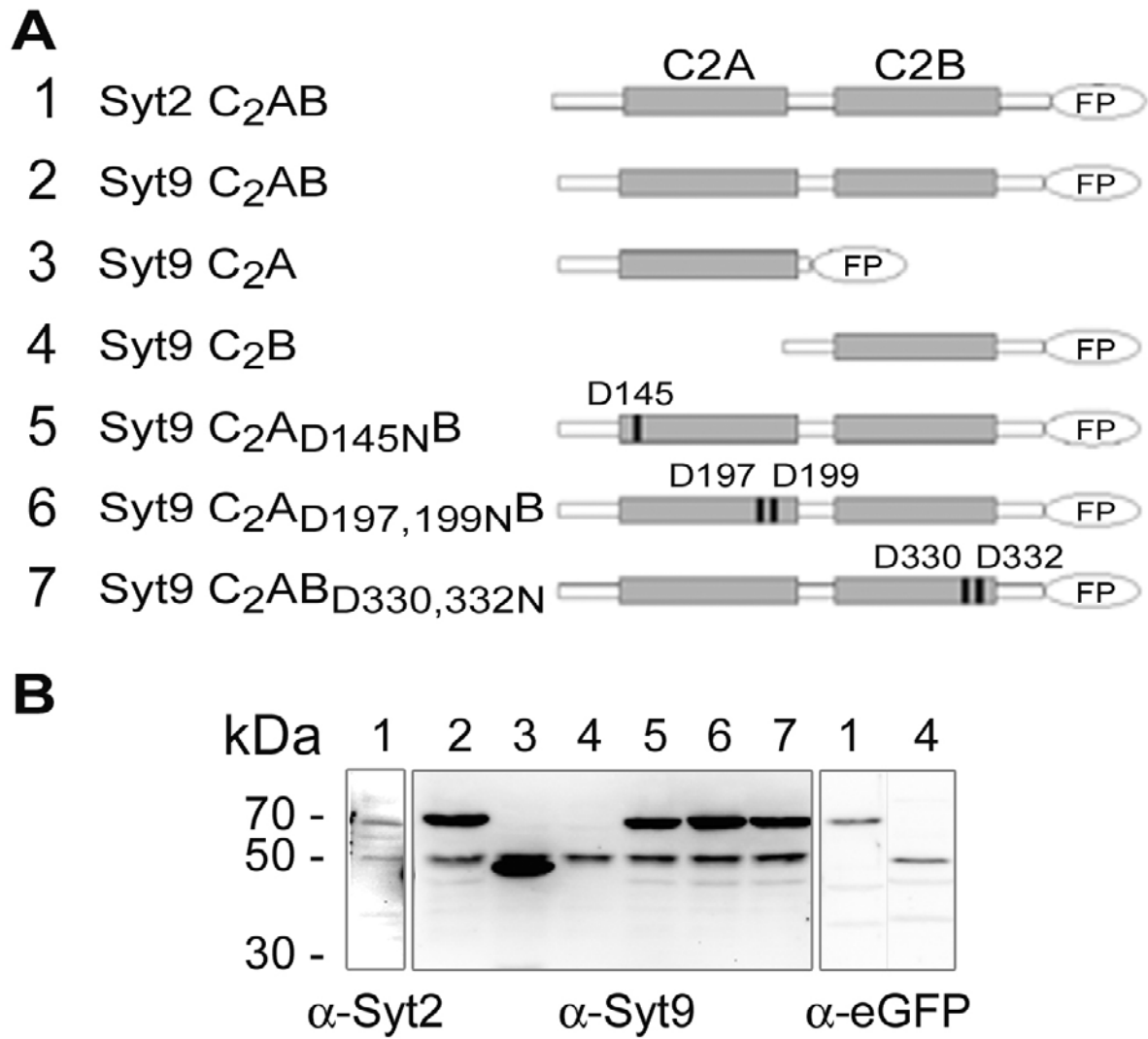
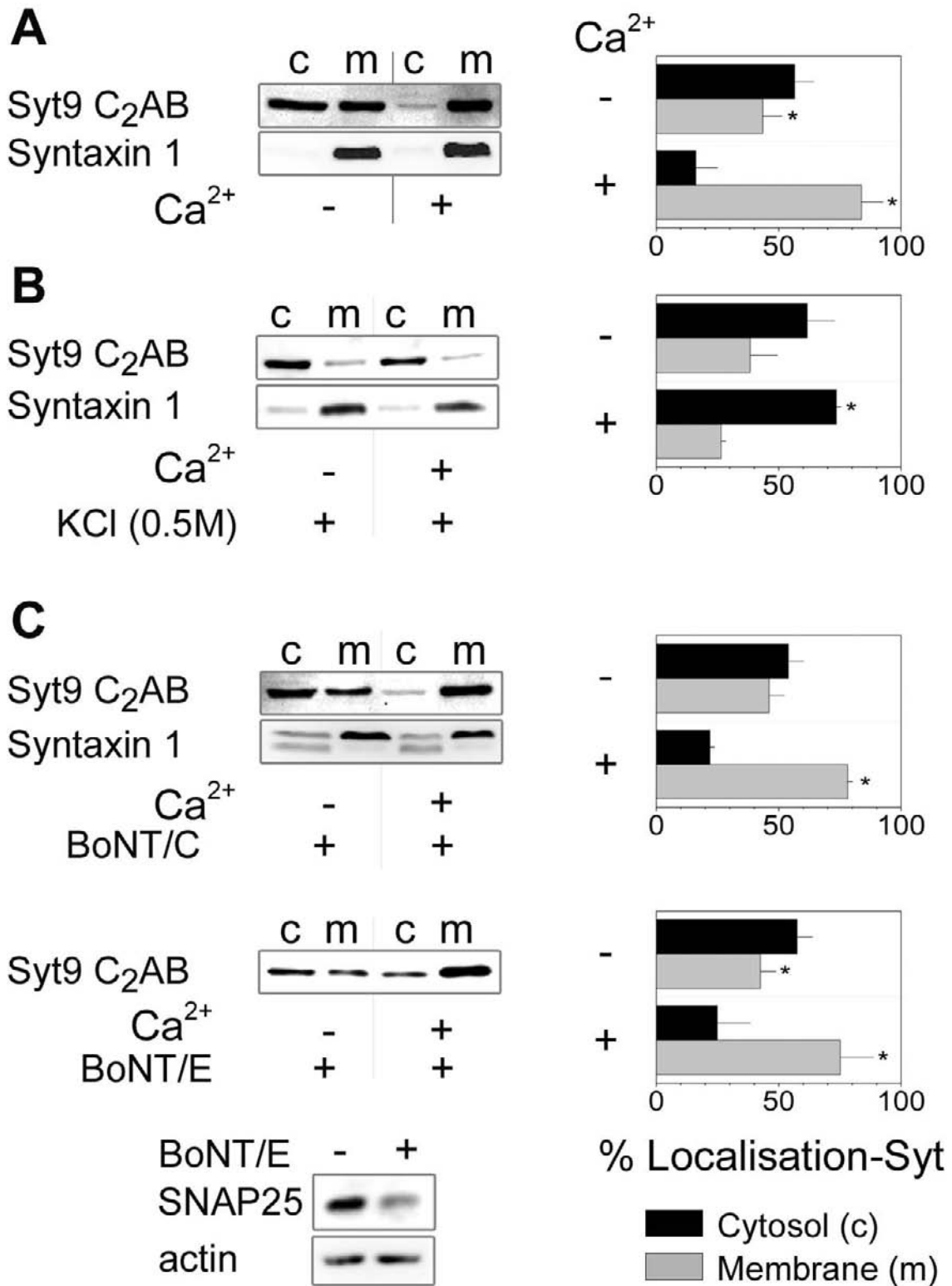


FIG 2



**FIG 3**

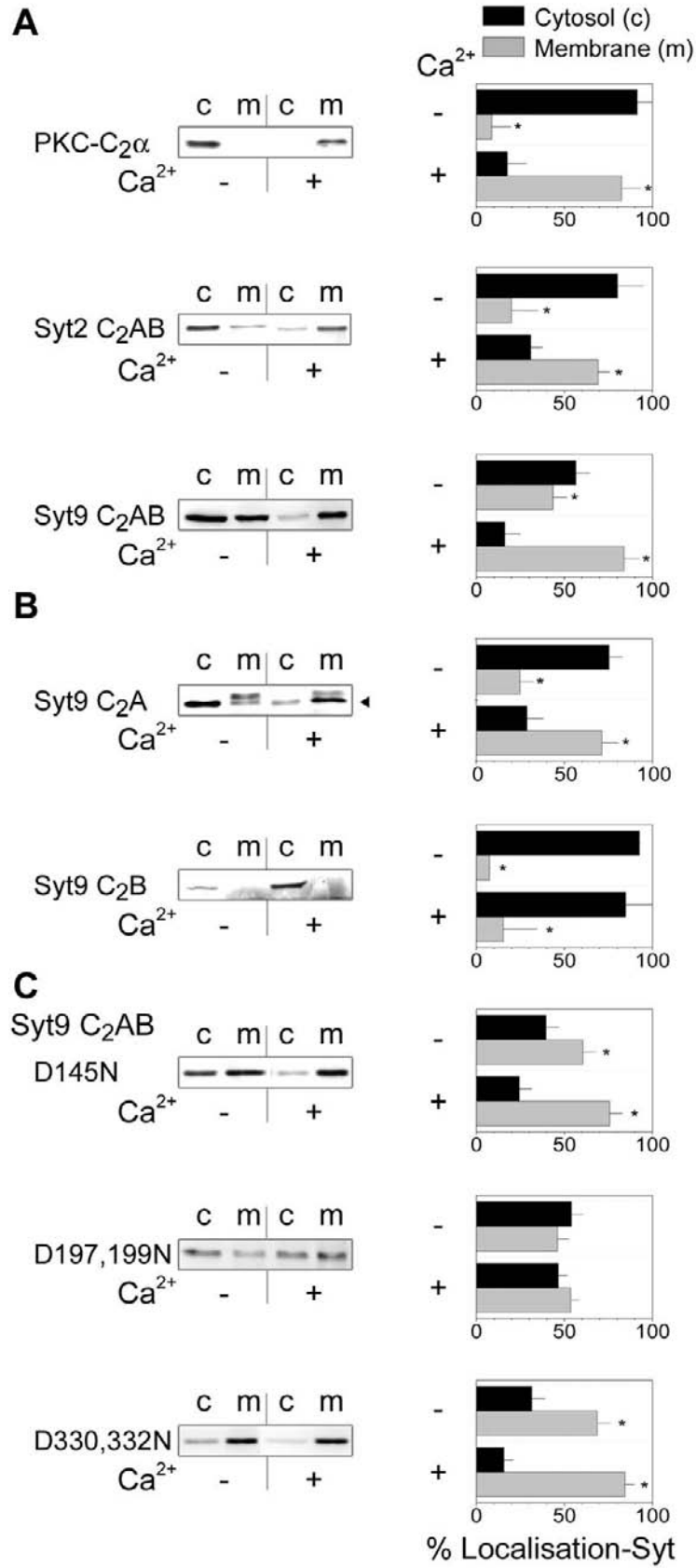
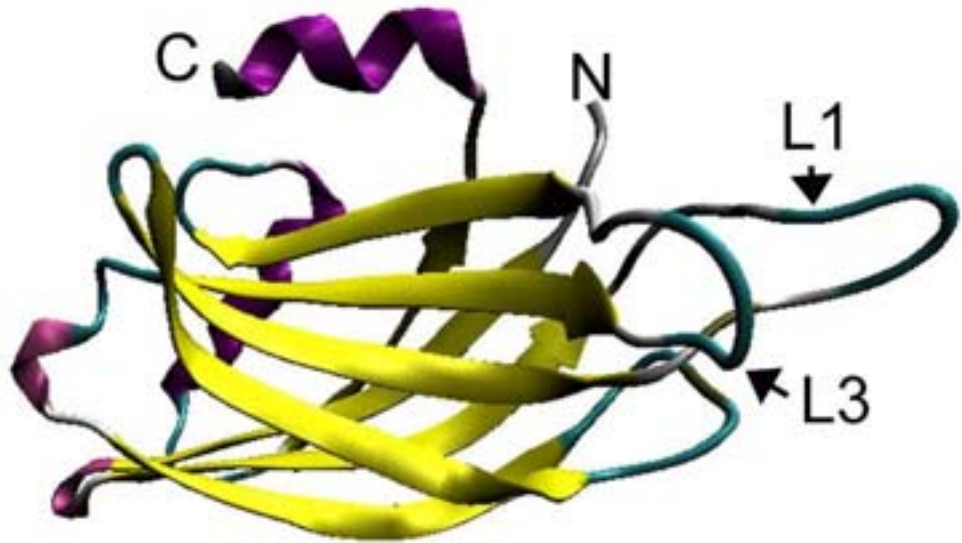




FIG 4

**A**



**B**

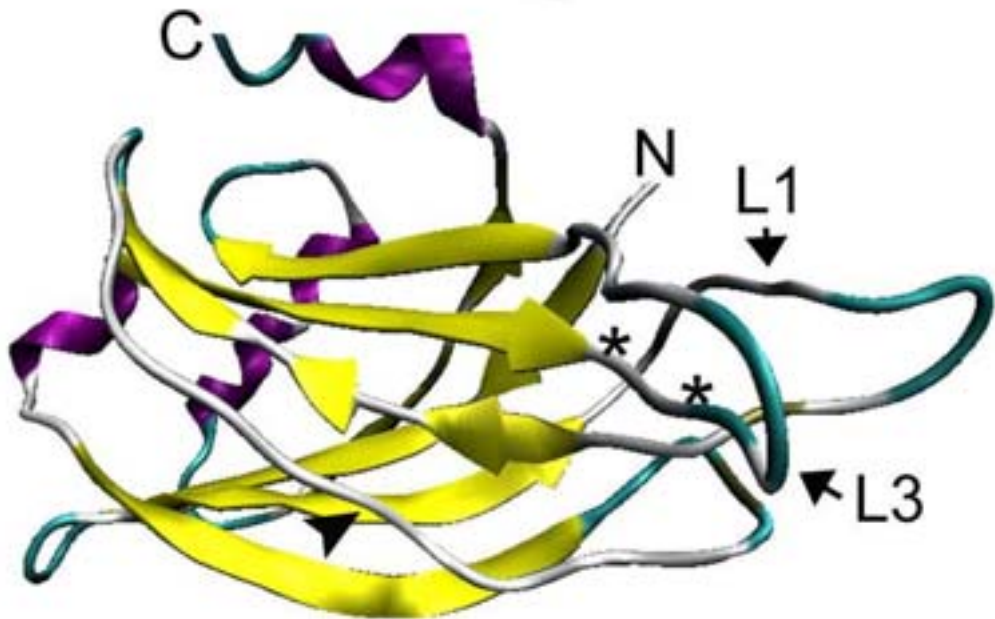


FIG 5

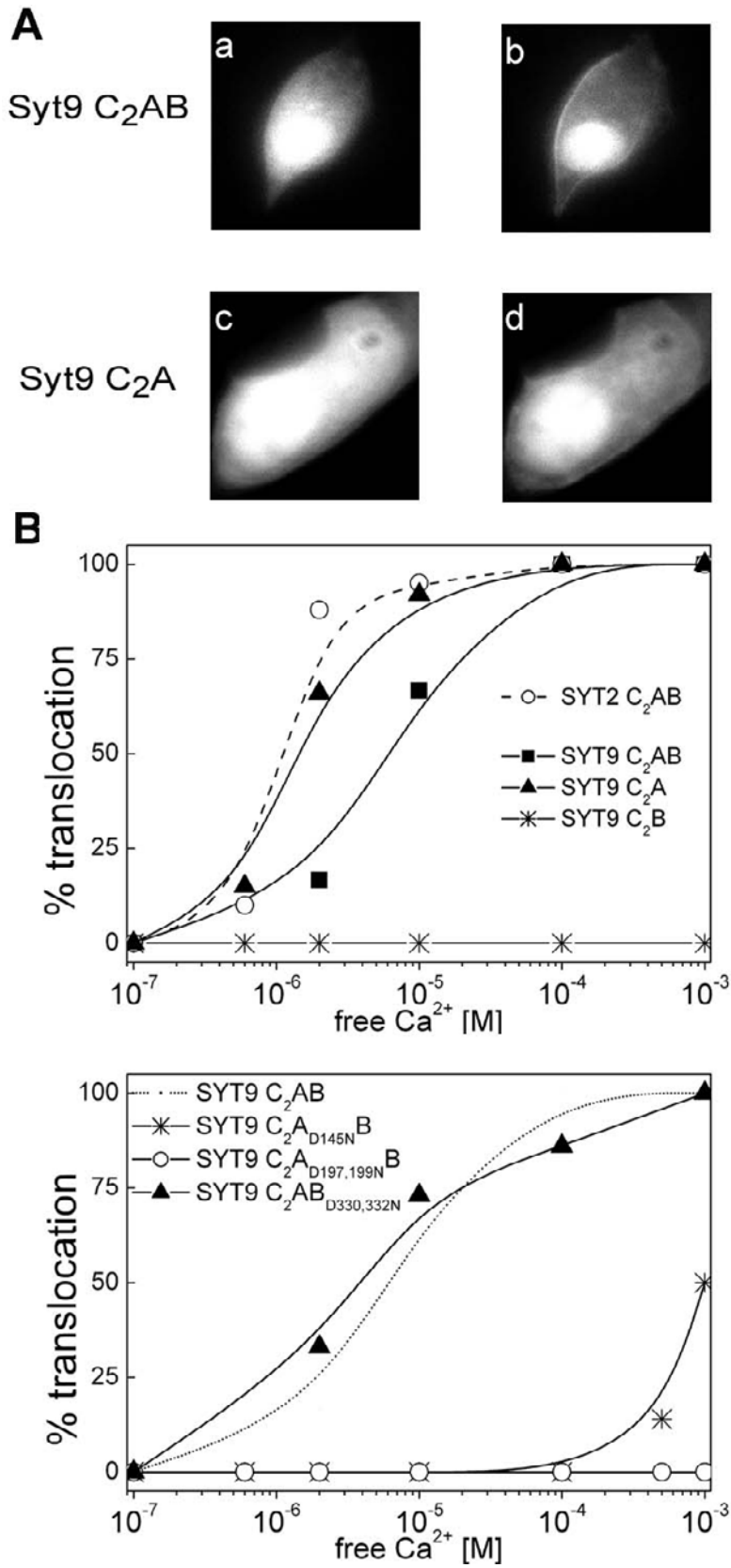


FIG 6

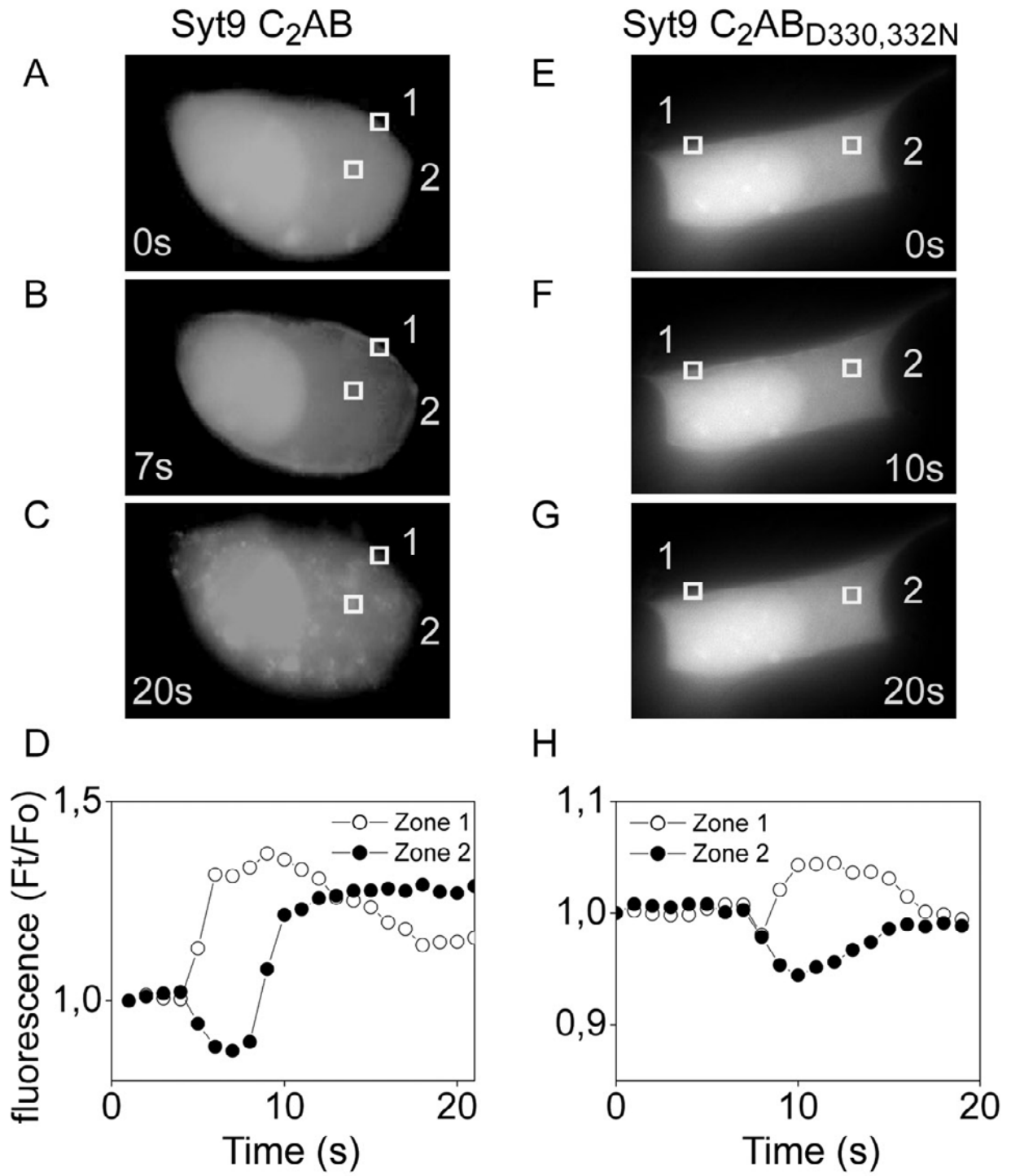
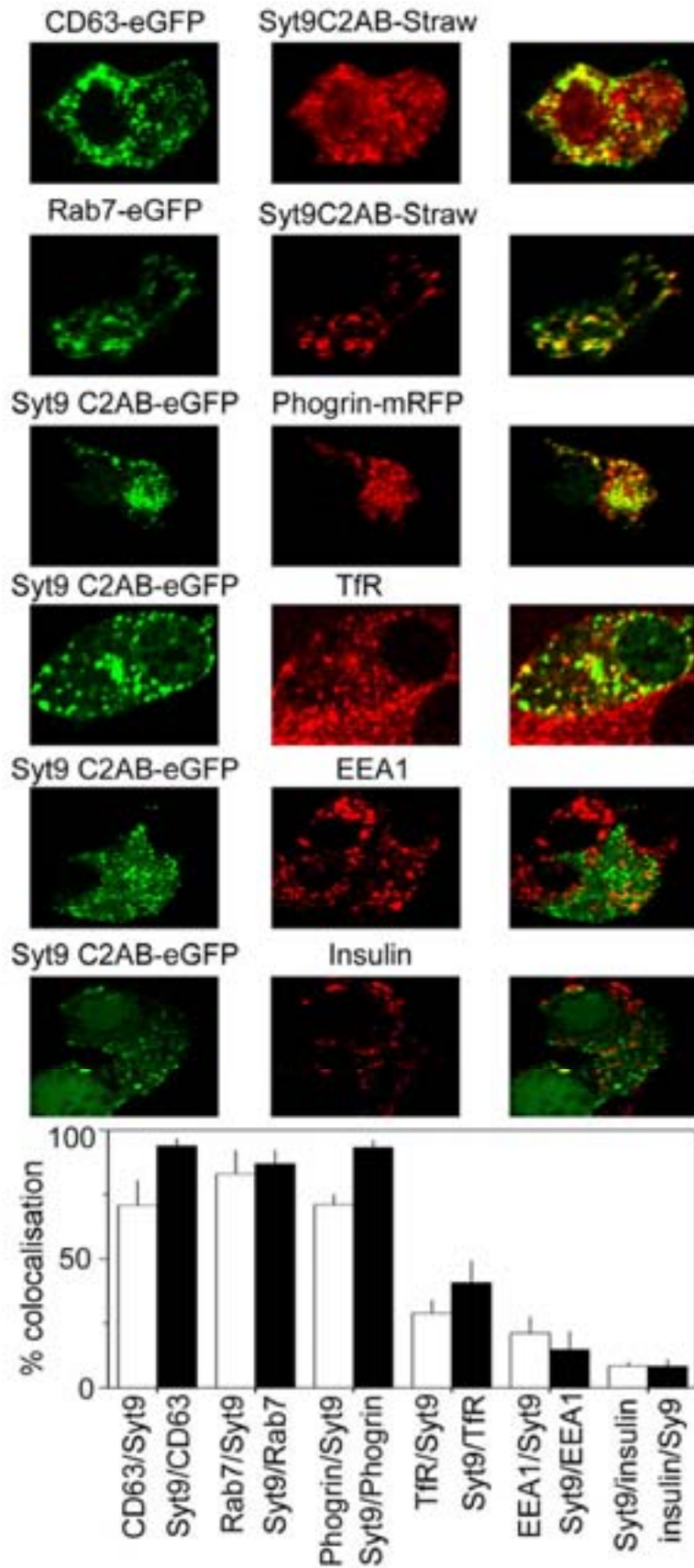


FIG 7



## Discussion

Dans ce travail, nous avons étudié les propriétés spécifiques de liaison aux membranes des domaines C2 de Syt 9 et leurs rôles distincts dans les cellules endocrines insulino-sécrétoires.

Nos résultats montrent que le domaine C2AB recombinant de Syt 9 se lie à la membrane plasmique pour des valeurs de calcium compatibles avec les concentrations calciques présentes lors de l'exocytose ( $EC_{50} \sim 10 \mu M$ ).

Nous avons aussi testé l'implication des protéines SNARE dans cette liaison de Syt 9 aux membranes. La coupure des protéines SNARE par les toxines clostridiales ne modifie pas la localisation de la protéine Syt 9 recombinante. La fixation de Syt 9 sur les membranes en présence de calcium ne nécessite pas la présence des protéines SNARE (syntaxine 1 et SNAP-25). Des résultats divergents ont été publiés sur la capacité de Syt 9 à lier les protéines SNARE en présence de calcium (Bhalla 2005 et Shin 2004). Nos observations n'excluent pas qu'il y ait des interactions entre Syt 9 et les protéines SNARE lors de la fusion membranaire mais montrent que la liaison avec les phospholipides est majoritairement importante dans la fixation aux membranes.

Nous avons également comparé le comportement de la protéine de fusion composée du domaine cytosolique de Syt 9 couplé à la eGFP, à celui de la protéine recombinante Syt 2 (domaine cytosolique de Syt 2 couplé à la eGFP), qui est un des senseurs calciques de la neurosécrétion dans les neurones. Nous avons observé trois grandes différences de comportement entre ces deux senseurs calciques. Dans un premier temps, nous avons constaté qu'en absence de calcium ou à de faibles concentrations calciques ( $0,1 \mu M$ ), Syt 9 C2AB est pré-attachée à la membrane plasmique, alors que Syt 2 C2AB est entièrement cytosolique. Cette particularité de Syt 9 dépend de la coopération des deux domaines C2 puisque les domaines isolés ne présentent pas cet attachement aux membranes indépendant du calcium. Une deuxième différence est observée au niveau de leur affinité de liaison aux membranes en présence de calcium. En effet, l'affinité de Syt 9 ( $EC_{50} \sim 10 \mu M$ ) est plus faible que celle mesurée pour Syt 2 ( $EC_{50} \sim 1 \mu M$ ). Ceci peut s'expliquer par le fait que la présence du C2B permet un pré-attachement de la protéine à la membrane, ce qui permet à Syt 9 de se lier aux membranes à faible concentration calcique malgré une faible affinité pour le calcium. La troisième différence concerne la distribution sous-cellulaire des protéines suite à la stimulation par le calcium. Dans un premier temps, la protéine Syt 9 C2AB-GFP se lie à la

membrane plasmique puis se retrouve localisée au niveau de structures intracellulaires identifiées comme un compartiment endosomal, tandis que Syt 2 C2AB-GFP se lie et reste au niveau de la membrane plasmique. Ces observations suggèrent l'existence de fonctions distinctes entre ces deux isoformes Syt 2 et Syt 9.

Un autre aspect de ce travail, a été d'étudier les caractéristiques de liaison des domaines C2 isolés afin de déterminer leur rôle dans la fixation aux membranes dépendante et indépendante du calcium. Le domaine C2A seul possède la capacité de lier la membrane plasmique en présence de calcium et son affinité est comparable à celle de la protéine recombinante Syt 2. Les résultats obtenus sont compatibles avec ceux décrits dans la littérature. Dans le cas du domaine C2B, quelle que soit la concentration de calcium libre ajoutée, aucune liaison *in vivo* aux membranes n'est visualisée. De précédents travaux ont obtenus des résultats *in vitro* comparables pour le domaine C2B de Syt 9 (Shin et al., 2004). Il semblerait que cette spécificité soit due à une séquence peptidique localisée dans la région polybasique du domaine C2B. Ces observations sont surprenantes en considérant la forte homologie de séquence entre les domaines C2B de Syt 1 et de Syt 9 (96 % d'homologie). Nous avons donc modélisé la structure du domaine C2B de Syt 9 à partir de la structure cristallographique de Syt 1 C2B, et nous n'observons pas de différences structurales majeures entre les deux domaines. La propriété du domaine C2B de Syt 9 de ne pas se lier seul aux membranes ne provient pas d'un changement structural majeur par rapport à Syt 1.

Nous avons généré des protéines mutées au niveau des domaines C2 pour déterminer la fonction spécifique de chaque domaine dans la distribution sous-cellulaire de Syt 9 après stimulation calcique. Ces mutations ponctuelles sur les domaines C2 abolissent la coordination du calcium sur les boucles des domaines C2. La présence du domaine C2A fonctionnel est nécessaire à la liaison de Syt 9 à la membrane plasmique. En revanche, la mutation du domaine C2B (D3,4N) n'empêche pas la localisation à la membrane plasmique, mais celle-ci inhibe la localisation de la protéine recombinante sur des structures vésiculaires de type endosomal. Le domaine C2B semble donc être impliqué dans le processus d'endocytose par des mécanismes encore inconnus qui pourraient passer par des interactions avec la protéine AP2 (Haberman et al., 2003; Haberman et al., 2005). Dans un type de cellules sécrétoires (RBL), Syt 9 est impliquée dans la voie de recyclage des vésicules entre le compartiment ERC et la membrane plasmique. D'après nos données, la liaison de la protéine recombinante Syt 9 à la membrane plasmique est une étape préliminaire et essentielle à la localisation dans ces structures endosomales. Dans Syt 1, la fixation du calcium par le

domaine C2B est nécessaire pour son rôle dans l'endocytose. Or dans notre étude la mutation D3,4N du domaine C2B inhibe la localisation de Syt 9 dans les endosomes.

En conclusion, le domaine C2A est responsable de la liaison de Syt 9 aux membranes dépendante du calcium, et le domaine C2B serait impliqué dans des processus de recyclage des vésicules par endocytose.

D'après ces travaux, il apparaît que les Syt se lient aux phospholipides des membranes en *trans*, c'est-à-dire sur la membrane plasmique. En effet, les études *in vitro* ne permettaient pas de répondre à cette question (Bai et al., 2000).

Cette étude est actuellement en révision auprès du *Biochemical Journal* et deux critiques majeures ont été faites concernant cette étude : l'absence d'une étude de colocalisation *in vivo* entre Syt 9 C2AB-GFP et les endosomes ; et la localisation nucléaire des constructions fusionnées à la GFP. En effet, la distribution de Syt 9 C2AB-GFP au niveau des endosomes a été réalisée par immunocytochimie après stimulation de la translocation par le calcium et la ionomycine et fixation des cellules. Actuellement, nous sommes en train de réaliser des expériences de vidéomicroscopie sur des cellules MIN6 co-transfectées avec les vecteurs codant la protéine Rab7-eGFP ou CD63-eGFP et Syt 9 C2AB-Strawberry. Ainsi, cette expérience permettra de localiser les protéines sans réaliser une étape de fixation.

D'après la littérature, il semble que la protéine GFP puisse entraîner une localisation nucléaire des protéines fluorescentes. En effet, dans une étude sur la localisation de la protéine Syt 1 C2A-eGFP, la construction a une localisation cytosolique et nucléaire (Evans et al., 2004). Cependant, cette localisation nucléaire ne gêne pas la translocation de la protéine suite à la stimulation des cellules par la ionomycine et le calcium. De plus, nous n'avons jamais observé de produits de dégradation de la protéine recombinante après analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. La fluorescence ne correspond donc pas à la protéine GFP libre. Nous sommes aussi en train de vérifier que la localisation nucléaire n'est pas induite par le calcium et pour cela nous mesurons les variations de fluorescence dans le noyau pendant la stimulation calcique d'une cellule.





# **RESULTATS-PARTIE IV**

*Etudes fonctionnelles de Syt 9*

*Florence Grise, Frédéric Boal, Valérie Lagrée and Jochen Lang*



## Introduction

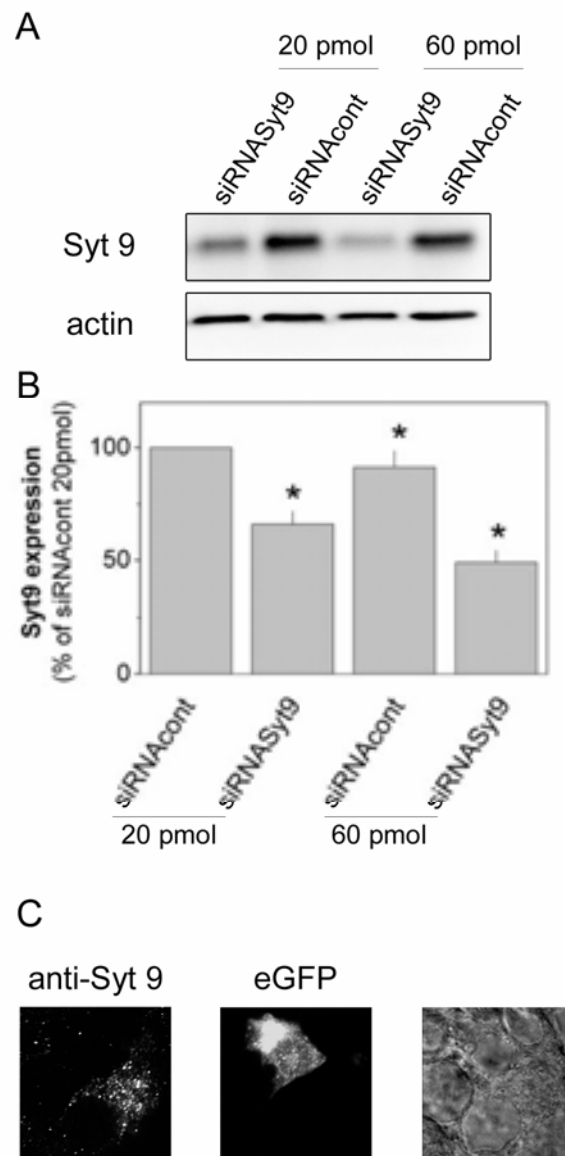
Dans les cellules primaires  $\beta$ -pancréatiques et les lignées dérivées insulino-sécrétoires, la protéine Syt 9 est localisée sur les vésicules à cœur dense (LDCV) contenant l'insuline. Dans ces cellules, l'inhibition de l'expression de Syt 9 par une approche d'ARN interférence, permet de diminuer la sécrétion d'insuline en réponse à un haut taux de glucose (Iezzi et al., 2005a; Iezzi et al., 2004). Syt 9 semble donc être impliquée dans la sécrétion d'insuline au niveau d'une étape tardive, c'est-à-dire dans l'exocytose des granules de sécrétion. Cependant, cette interprétation ne tient pas compte de deux observations.

Premièrement, en présence de forskoline et d'IBMX, l'absence de Syt 9 n'a plus d'effet inhibiteur sur la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Iezzi et al., 2005a). Ces deux molécules ne permettent pas à elles seules d'induire une sécrétion d'hormone (Henquin, 2000; Henquin et al., 2003). Néanmoins, la forskoline active l'adénylate cyclase et donc indirectement la protéine kinase AMPc dépendante (PKA), ce qui augmente ainsi la sécrétion déclenchée par le calcium. Au niveau cellulaire et moléculaire, l'activation de la PKA potentialise l'influx calcique à travers les canaux calciques de type L et aggrandit également le pool de vésicules relargables (Yang and Gillis, 2004). Syt 9 pourrait donc intervenir dans des étapes dépendantes du calcium plus précoces que l'exocytose.

Deuxièmement, le rôle de Syt 9 ne semble pas se restreindre à être uniquement le senseur calcique de l'exocytose des LDCV. Dans les cellules insulino-sécrétoires, la distribution de Syt 9 suite à un fractionnement cellulaire sur un gradient de saccharose, montre que Syt 9 est aussi localisée dans les fractions correspondant aux SLMV et aux endosomes (Monterrat et al., en révision). Dans une lignée de cellules sécrétoires dérivées des mastocytes (les cellules RBL), Syt 9 est localisée dans le compartiment endosomal de recyclage et serait impliquée dans l'endocytose clathrine-dépendante grâce à des interactions entre la protéine AP-2 et le domaine C2B de Syt 9. De plus, nous avons récemment montré que la mutation du domaine C2B empêchait la localisation de Syt 9 au niveau des endosomes dans les cellules insulino-sécrétoires. Etant donné que l'exocytose est extrêmement liée à l'endocytose, Syt 9 pourrait également réguler des étapes dépendantes du calcium dans le recyclage des vésicules de sécrétion dans les cellules  $\beta$  endocrines ou être impliquée dans l'exocytose des SLMV.

Afin de déterminer précisément le rôle de Syt 9 dans la sécrétion régulée d'insuline, nous avons diminué l'expression de Syt 9 endogène dans trois lignées insulino-sécrétoires et nous avons étudié l'effet de cette diminution sur l'exocytose et le trafic vésiculaire des LDCV.





**Figure r-1 : Réduction de l'expression de Syt 9 dans les cellules HIT-T15 et MIN6 par ARN interférence**

Les cellules HIT-T15 sont transfectées de manière transitoire avec les concentrations de siRNA spécifique (siRNASyt 9) ou contrôle (siRNAcont) indiquées. 72 heures après transfection, les homogénats cellulaires sont déposés sur gel de polyacrylamide et analysés par immunoblot en utilisant des anticorps anti-Syt 9 et anti-actine (A). Les niveaux d'expression de la protéine Syt 9 sont quantifiés (B) par comparaison à l'expression de Syt 9 dans les cellules transfectées avec 20 pmol de siRNA contrôle (siRNAcont) (n=5; \*, p<0,05). (C) L'effet du siRNA Syt 9 est vérifié par immunofluorescence avec un anticorps anti-Syt 9 dans les cellules MIN6 co-transfectées avec le vecteur codant pour la protéine eGFP (30%) et le pSuper Syt 9 (70%). Une cellule non transfectée permet de vérifier le marquage de Syt 9 et d'observer l'expression de Syt 9.

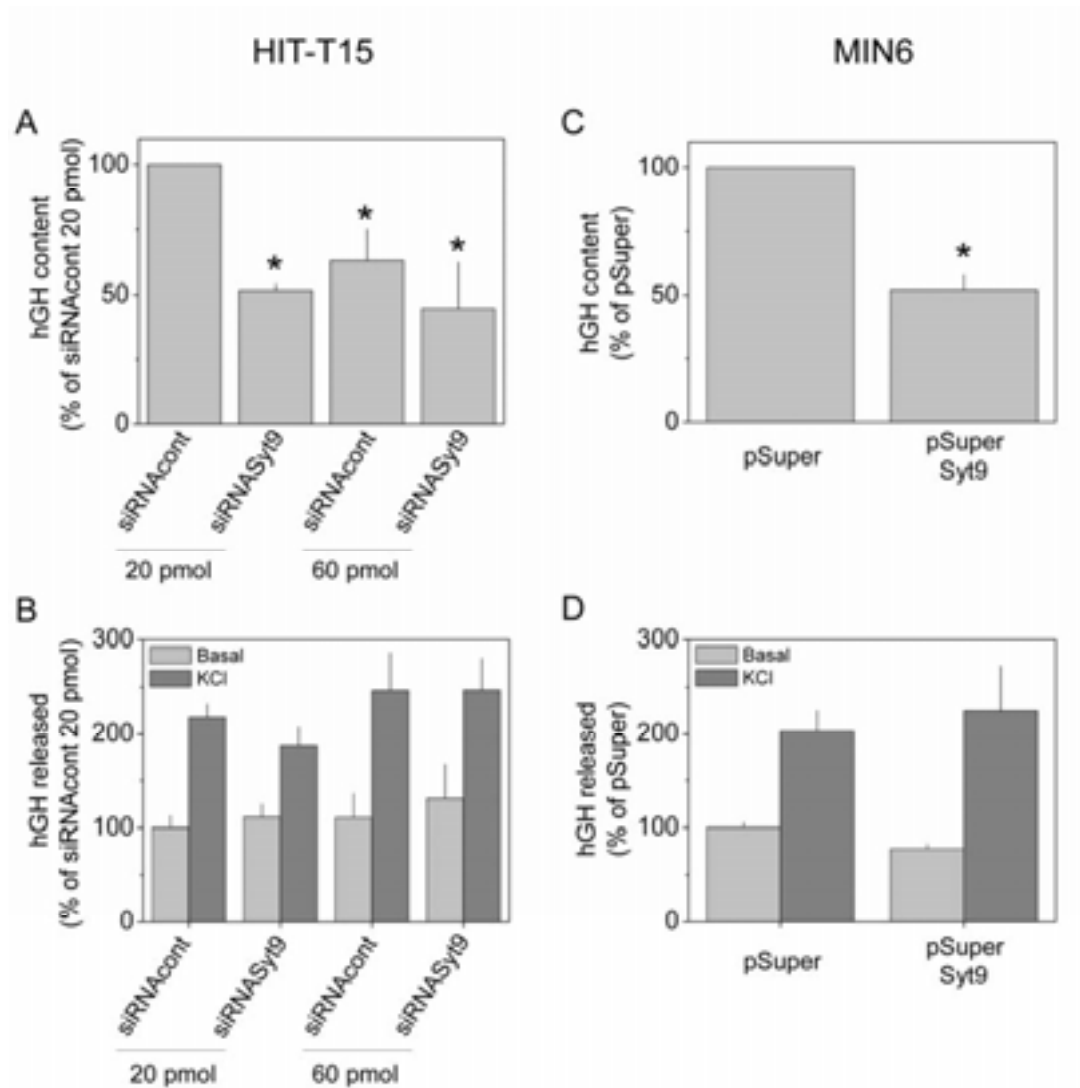
## I. ETUDE DE LA FONCTION DE SYT 9 PAR INHIBITION DE SON EXPRESSION PAR ARN INTERFERENCE DANS LES LIGNEES HIT-T15 ET MIN6

### A. Diminution de l'expression de Syt 9 par l'utilisation de siRNA dans les lignées cellulaires HIT-T15 et MIN6

Pour étudier le rôle de Syt 9 dans différentes lignées cellulaires insulino-sécrétoires, nous avons utilisé une approche d'ARN interférence. La diminution ou l'inhibition d'expression de la protéine Syt 9 permettra de mieux définir le rôle de cette protéine dans ces lignées cellulaires. La première étape a consisté à définir dans l'ARNm de Syt 9 de souris une ou plusieurs séquence(s), spécifique(s) à l'isoforme Syt 9, cible(s) des siRNA (*small interfering RNA*). Une séquence aléatoire ne correspondant à aucune séquence du génome de la souris a été utilisée comme siRNA contrôle, cette séquence est référencée comme contrôle par Qiagen (siRNAcont). Les différents siRNA, ainsi choisis, ont été testés dans les lignées insulino-sécrétoires HIT-T15 et MIN6 (résultats non présentés). Un seul siRNA appelé siRNA Syt 9, a réduit significativement l'expression endogène de Syt 9 par comparaison au siRNA contrôle (siRNAcont). La séquence cible du siRNA Syt 9 est située dans le domaine C2B de Syt 9. Chez le hamster, la séquence de l'ARNm de Syt 9 n'est pas connue. Nous avons réalisé une RT-PCR dans les cellules HIT-T15 pour déterminer si la séquence reconnue par le siRNA Syt 9 est bien identique dans la souris et le hamster. Les résultats du séquençage suivi d'un alignement de séquence avec l'isoforme Syt 9 de souris, ont montré que la séquence cible du siRNA était identique entre les isoformes Syt 9 de souris et de hamster (résultats non présentés).

Nous avons déterminé la quantité optimale de siRNA pour obtenir une meilleure efficacité du siRNA Syt9 sur l'expression endogène de Syt 9 dans la lignée insulino-sécrétoire HIT-T15 (figure r-1A et 1B). Quelle que soit la concentration de siRNA transfectés, 20 pmol ou 60 pmol, l'expression de Syt 9 est diminuée significativement par le siRNA Syt 9 par rapport aux cellules transfectées par le siRNAcont.

Ces premiers résultats ont été obtenus avec des siRNA transcrits *in vitro*. Ils ont permis de valider la séquence siRNA Syt 9 en testant son efficacité sur l'expression de la protéine endogène. Cependant, l'utilisation de SiRNA transcrits *in vitro* peut présenter certains inconvénients comme un coût de synthèse important, une variabilité dans le taux de transcription ou une sensibilité aux RNases. De façon plus générale, l'utilisation de molécules



**Figure r-2 : L'inhibition de l'expression de Syt 9 réduit la quantité intracellulaire d'hormone mais pas la sécrétion induite par dépolarisation dans les cellules HIT-T15 et MIN6**

(A et B) Les cellules HIT-T15 sont co-transfectées avec le siRNASyt9 ou le siRNAcont, et le plasmide contenant l'ADNc codant l'hormone de croissance (hGH). 72 heures après transfection, les quantités totales intracellulaires d'hormone hGH sont dosées (A) et les quantités d'hGH sécrétées sous condition basale ou suite à une stimulation par le KCl sont déterminées. Les résultats sont rapportés aux contenus intracellulaires en hormone et normalisés à la condition contrôle basale (B). n=3; \*, p<0,05.

(C et D) Les cellules MIN6 sont co-transfectées avec le plasmide pSuper Syt 9 ou le vecteur vide pSuper, et le plasmide contenant l'ADNc codant l'hGH. 72 heures après transfection, les quantités d'hGH intracellulaire (C). Les quantités d'hGH sécrétées sont dosées et les résultats sont rapportés aux contenus intracellulaires en hormone et normalisés à la condition contrôle basale (D). n=4; \*, p<0,05.



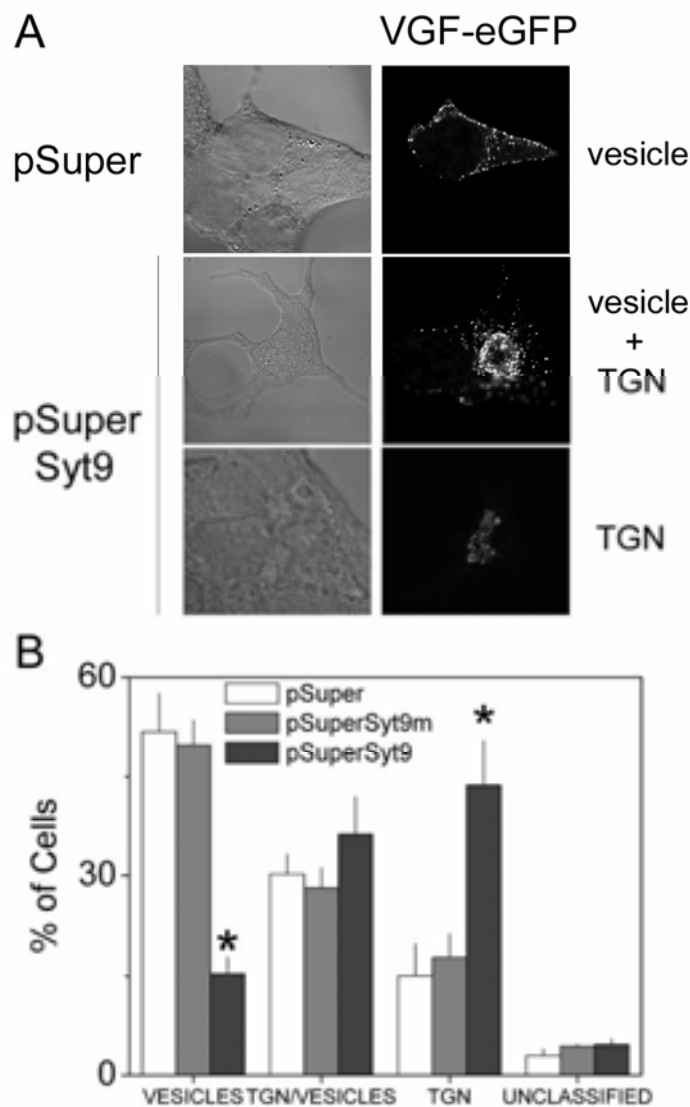
de siRNA ne permet pas de contrôler totalement les conditions de transfection et notamment les cotransfections ADN/ARN (Amarzguioui et al., 2005). Pour s'affranchir de ces difficultés, nous avons inséré la séquence du siRNA Syt 9 dans un vecteur plasmidique pSuper qui permet la synthèse dans la cellule de siRNA fonctionnels. La construction pSuper Syt9 ainsi obtenue est cotransfectée dans les cellules MIN6 de souris avec un vecteur rapporteur exprimant la protéine GFP (*Green Fluorescent Protein*) (figure r-1C). Les deux vecteurs sont mélangés selon un ratio de 70% de pSuper Syt 9 et 30 % de vecteur exprimant le eGFP. D'après les probabilités, toutes les cellules exprimant la protéine fluorescente eGFP ont également été transfectées avec le vecteur pSuper Syt 9. Dans les cellules MIN6 fluorescentes exprimant le siRNA Syt 9, l'expression de Syt 9 est vérifiée par immunofluorescence et une diminution nette est clairement observée.

L'ensemble de ces résultats a permis de montrer l'efficacité de la stratégie d'ARN interférence dans les cellules insulino-sécrétoires de souris et de hamster.

### **B. Effet du siRNA Syt 9 sur la quantité intracellulaire d'hormone et la sécrétion stimulée par dépolarisation**

Après avoir vérifié l'efficacité du siRNA Syt 9 et du vecteur pSuper Syt 9, nous avons testé l'effet de la diminution de l'expression de Syt 9 sur le contenu des granules et leur capacité à sécréter suite à une dépolarisation de la membrane plasmique par une solution de potassium.

Les cellules sont co-transfectées par les siRNA (HIT-T15) ou les vecteurs plasmidiques pSuper (MIN6), et un plasmide rapporteur contenant l'ADNc de l'hormone de croissance humaine (hGH). L'hGH, exprimée dans les cellules insulino-sécrétoires, est adressée aux LDCV ce qui permet d'observer la sécrétion régulée des cellules contenant simultanément les deux plasmides différents (Lajus et al., 2006). Nous avons stimulé la sécrétion des vésicules contenant l'hGH par une dépolarisation de la membrane plasmique induite par 50 mM de KCl puisque les lignées cellulaires MIN6 et HIT-T15 ont perdu la capacité de sécréter en réponse à une augmentation du glucose. Pour chaque condition de transfection dans les deux lignées cellulaires, la quantité intracellulaire en hGH est déterminée et les quantités d'hormone sécrétées sont rapportées aux quantités intracellulaires totales d'hormone (figure r-2). L'inhibition de l'expression de Syt 9 altère significativement les quantités intracellulaires en hormone de croissance dans les cellules HIT-T15 et MIN6 transfectées (figure r-2A et 2C).



**Figure r-3 : L'inhibition de l'expression de Syt 9 réduit la quantité de vésicules de sécrétion dans les cellules MIN6**

Les cellules MIN6 sont co-transfectées transitoirement avec les plasmides pSuper, pSuper Syt 9 mutated (contenant une séquence mutée du siRNA Syt 9) ou pSuper Syt 9 et un plasmide exprimant l'hormone peptidique VGF fusionnée à la protéine eGFP (pVGF-eGFP). 72 heures après transfection, les cellules sont fixées, observées et comptées sous microscope confocal à fluorescence (A). Dans les cellules co-transfectées avec le pSuper, le VGF-eGFP est localisé dans des vésicules. Dans les cellules transfectées avec le pSuper Syt 9, une réduction de la localisation de la protéine fluorescente dans les vésicules périphériques et l'apparition d'une localisation de la protéine VGF-eGFP au niveau du TGN sont observées. La quantification de la distribution de la protéine VGF-eGFP dans les cellules co-transfectées est reportée en B. n=7 coverslips/conditions et 43 à 79 cellules observées /coverslips; \*, p<0,05.

Néanmoins, dans les deux types cellulaires, aucun effet de la réduction de l'expression de Syt 9 sur la sécrétion d'hormone stimulée par le KCl n'est observé.

Dans ces deux lignées cellulaires insulino-sécrétoires, Syt 9 ne semble donc pas être nécessaire à la libération du contenu des granules sécrétoires induite par la dépolarisation des cellules. Cependant, il est probable que Syt 9 soit impliquée dans une autre étape lors de la sécrétion d'insuline puisque la réduction de l'expression de Syt 9 induit une diminution des quantités intracellulaires totales d'hormone. Nous avons donc étudié l'effet de la diminution de l'expression de Syt 9 sur le trafic vésiculaire des LDCV.

### **C. Implication de Syt 9 dans le trafic vésiculaire des granules de sécrétion**

Afin de mieux comprendre les mécanismes qui relie la diminution de l'expression de Syt 9 et la réduction de la quantité totale en hormone hGH, nous avons suivi le trafic des vésicules de sécrétion en absence de Syt 9. Pour cela, nous avons utilisé le peptide hormonal VGF couplé à la GFP, qui est un marqueur des LDCV (Benson and Salton, 1996). Nous avons, dans un premier temps, vérifié par immunofluorescence que la protéine de fusion VGF-eGFP était localisée sur les granules d'insuline dans les cellules MIN6 (résultats non présentés).

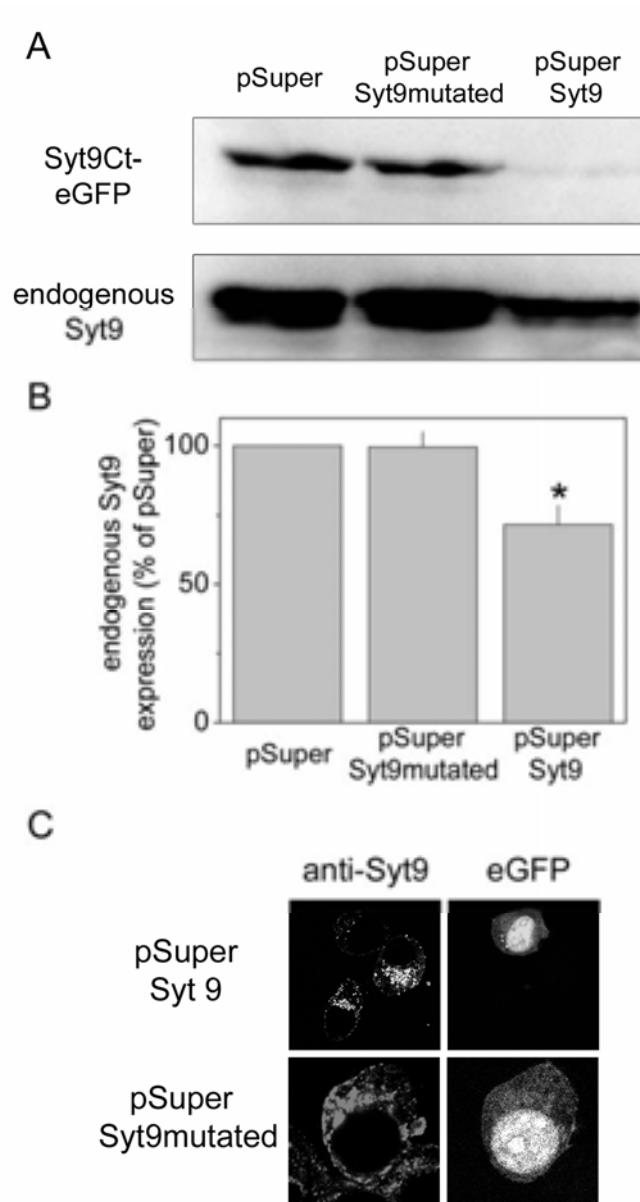
D'après les données de la littérature, le contrôle le plus rigoureux pour des expériences d'ARN interférence, correspondrait à la séquence du siRNA utilisé mais, mutée et rendue ainsi inactive (Du et al., 2005). Nous avons donc construit un contrôle supplémentaire appelé pSuper Syt 9 mutated (pSuperSyt 9m) qui exprime le siRNA Syt 9 muté au niveau de quatre nucléotides, ce qui le rend inactif.

Les cellules MIN6 sont donc transfectées avec le vecteur pVGF-eGFP et les différents pSuper (figure r-3). La localisation sub-cellulaire de VGF-eGFP est analysée pour les différentes conditions de transfection. Dans les conditions contrôles (pSuper et pSuper Syt 9 mutated), la protéine fluorescente est majoritairement retrouvée dans les vésicules périphériques (50%) et à 30% dans les vésicules périphériques et le TGN. Lors de la diminution de l'expression de Syt 9 dans les cellules, la protéine VGF-eGFP ne se retrouve plus majoritairement dans les vésicules périphériques (15%) mais essentiellement au niveau du réseau TGN (44%). Il semblerait que l'absence de Syt 9 modifie la localisation de la protéine VGF-eGFP au niveau des LDCV.

D'après l'ensemble de ces résultats, nous n'observons pas d'effet du siRNA Syt 9 sur la sécrétion stimulée par une dépolarisation au KCl mais la perte de Syt 9 réduit fortement les contenus en hormone. De plus, Syt 9 semble intervenir dans le trafic vésiculaire. Ces observations sont un peu contradictoires avec le seul rôle présumé de senseur calcique de l'exocytose calcium-dépendante de Syt 9 dans la fusion membranaire dans les INS-1E (Iezzi et al., 2004).

Aussi, nous avons décidé d'observer dans les cellules INS-1E, l'effet du siRNA Syt 9 sur la sécrétion suite à différentes stimulations.





#### Figure r-4 : Réduction de l'expression de Syt 9 dans les cellules INS-1E

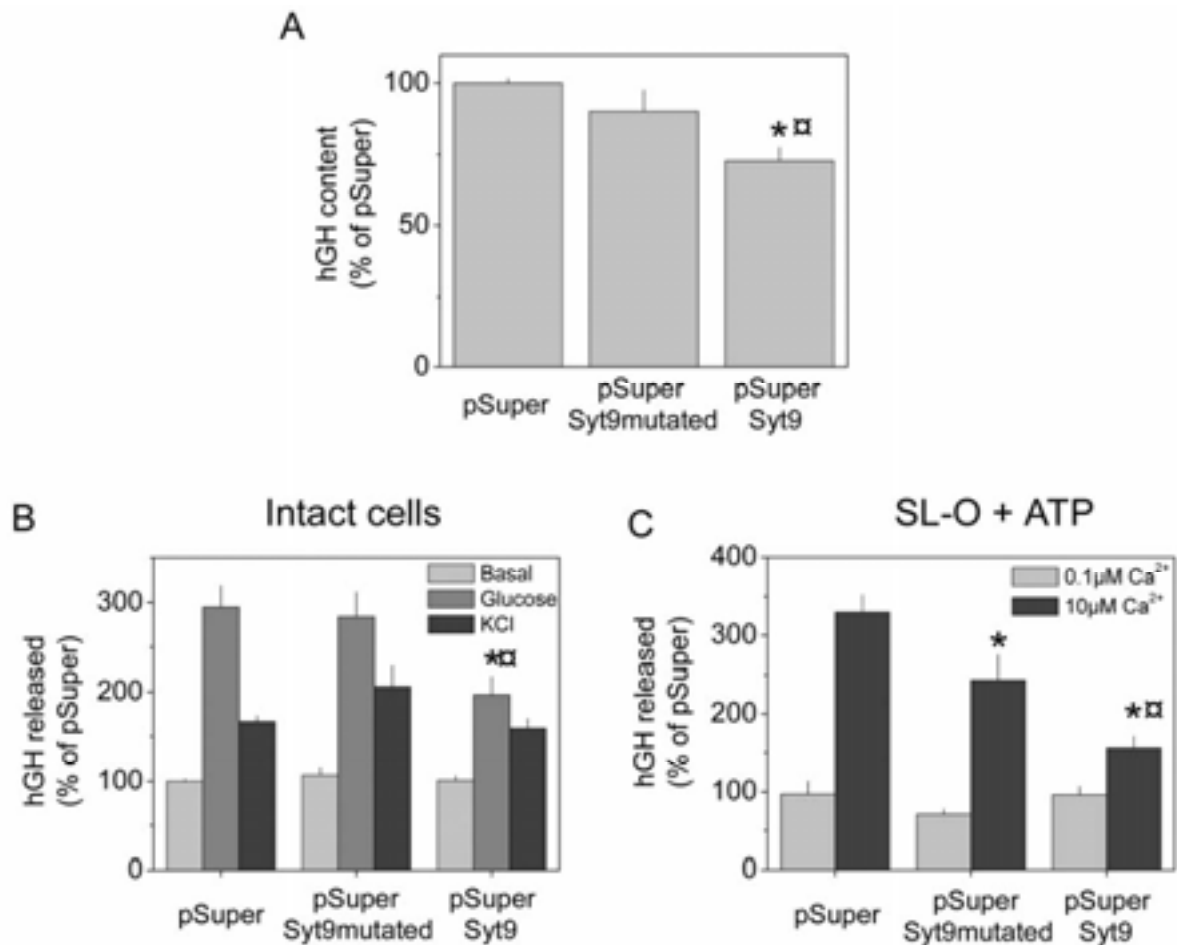
Les cellules INS-1E sont transfectées avec 70 % d'ADN correspondant aux vecteurs pSuper vide, pSuper Syt 9 mutated ou pSuper Syt 9, et 30 % du vecteur portant l'ADNc codant la protéine Syt 9 Ct-eGFP (domaine cytosolique de Syt 9 couplé à la protéine eGFP). Trois jours après transfection, les homogénats cellulaires sont déposés sur gel de polyacrylamide et révélés avec l'anticorps anti-Syt 9, qui détecte Syt 9Ct-eGFP et Syt 9 endogène (A). La quantification de l'expression de Syt 9 endogène est reportée (B) (n=9 ; \*, p<0,05). La spécificité des pSuper Syt 9 et pSuper Syt 9 mutated est observée en immunofluorescence sur les cellules transfectées avec le vecteur d'expression codant la protéine GFP (30%) et l'un ou l'autre des deux vecteurs pSuper (70%).

## II. ETUDE DE LA FONCTION DE SYT 9 DANS LA LIGNEE INS-1E PAR ARN INTERFERENCE

Dans un premier temps, nous avons vérifié que la séquence cible du siRNA chez le rat était identique à la séquence de Syt 9 chez la souris. Nous avons ensuite transfecté les cellules INS-1E avec le vecteur pSuper Syt9, le vecteur contrôle pSuper Syt 9mutated ou le pSuper vide, et nous avons quantifié l'expression de Syt 9 endogène dans les cellules transfectées (figure r-4A et 4B). L'utilisation du pSuper Syt 9 diminue spécifiquement l'expression de Syt 9 endogène de 30% par rapport au contrôle pSuper Syt 9 mutated. Cependant, lorsque les cellules co-expriment le siRNA Syt 9 et la protéine cytosolique Syt 9Ct-eGFP, la diminution de l'expression de Syt 9Ct-eGFP est totale. Le vecteur pSuper Syt 9 est donc efficace dans la lignée INS-1E. Cette réduction de l'expression de la protéine Syt 9 endogène est aussi observée en immunofluorescence dans les cellules INS-1E transfectées avec le vecteur rapporteur contenant l'ADNc codant pour la protéine GFP (30 %) et le vecteur pSuper Syt 9 (70%). Ainsi, toutes les cellules fluorescentes possèdent le vecteur pSuper Syt 9 et n'expriment plus la protéine Syt 9 (figure r-4C).

Pour comprendre le rôle de Syt 9 dans la lignée INS-1E, nous avons étudié la sécrétion d'hormone de croissance humaine (hGH) après transfection des cellules par les différents vecteurs pSuper. Les cellules sont transfectées avec le vecteur portant l'ADNc codant pour l'hGH (30%) et un des trois plasmides pSuper (70%). Lorsque les cellules INS-1E sont transfectées avec le vecteur pSuper Syt 9, les quantités intracellulaires totales d'hGH sont diminuées par rapport au contrôle pSuper vide qui n'exprime pas de siRNA (figure r-5A). Ces données sont comparables à celles obtenues dans les deux autres lignées insulino-sécrétoires MIN6 et HIT-T15 qui présentent une diminution de la concentration intracellulaire totale d'hormone lorsque l'expression de Syt 9 est réduite.

Nous avons dosé l'hGH sécrétée suite à une stimulation de 30 minutes au glucose (15 mM) ou au KCl (50 mM) dans les cellules INS-1E et les valeurs sont rapportées à la quantité intracellulaire totale d'hGH de chaque condition (figure r-5B). La réduction de l'expression de Syt 9 dans les cellules INS-1E, diminue significativement la sécrétion d'hormone en réponse à l'augmentation du glucose (environ 34%). En revanche, la sécrétion en réponse à une dépolarisation induite par le KCl n'est pas altérée par l'absence de la protéine Syt 9. Cette absence de réduction de la sécrétion d'hormone suite à la stimulation par le potassium est en accord avec les résultats obtenus dans les cellules HIT-T15 et MIN6.



### Figure r-5 : Effet du siRNA Syt 9 sur la sécrétion régulée dans les cellules INS-1E

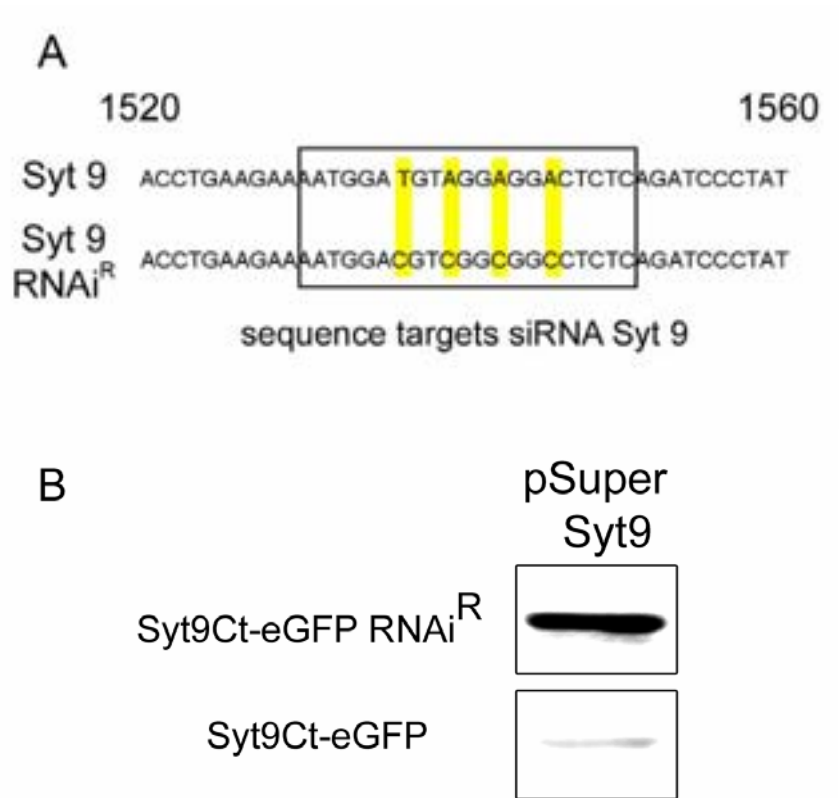
Les cellules INS-1E sont transfectées transitoirement avec 30% du vecteur d'expression codant l'hormone de croissance (hGH) et 70% des vecteurs pSuper. Les quantités intracellulaires d'hormone hGH sont dosées (A) et normalisées par rapport à la quantité intracellulaire d'hGH dans les cellules transfectées avec le vecteur pSuper (n=14, comparaison au pSuper \*,  $p < 0,05$  ; comparaison au pSuper syt 9 mutated  $\square$ ,  $p < 0,05$ ). Les valeurs d'hGH sécrétées pendant 30 minutes par une stimulation au glucose (15 mM) ou au KCl (50 mM) sont normalisées au contenu intracellulaire en hGH (B) (n=8 ; comparaison au pSuper \*,  $p < 0,05$  ; comparaison au pSuper syt 9 mutated  $\square$ ,  $p < 0,05$ ). (C) Les cellules sont perméabilisées par la streptolysine-O et l'exocytose a été directement stimulée par 10 μM de Ca<sup>2+</sup> libre en présence d'ATP (2 mM). Les quantités d'hGH sécrétées sont dosées et reportées en fonction des contenus intracellulaires en hormone (n=6 ; comparaison au pSuper \*,  $p < 0,05$  ; comparaison au pSuper syt 9 mutated  $\square$ ,  $p < 0,05$ ).



Par ailleurs, dans les cellules INS-1E perméabilisées à la streptolysine-O, et stimulées par 10  $\mu$ M de calcium libre et de l'ATP (2 mM), les quantités intracellulaires sont aussi réduites par rapport aux deux contrôles (figure r-5A) et la sécrétion d'insuline est diminuée de 40% lorsque l'expression de la protéine Syt 9 est inhibée (figure r-5C).

En utilisant ce même type d'analyse, nous n'avons pas pu observer l'effet de l'absence de Syt 9 sur l'exocytose stimulée uniquement par le calcium (résultats non montrés). En effet, nous avons stimulé l'exocytose par une solution de calcium libre à 10  $\mu$ M en absence d'ATP mais aucune sécrétion d'hormone n'a été observée suite à cette stimulation des cellules, quelle que soit la condition de transfection (pSuper, pSuperSyt9m ou psuper Syt9).

D'après ces résultats et les données obtenues suite à une stimulation au KCl qui ne stimule que l'exocytose  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante, il semble que la perte de Syt 9 ait un effet uniquement lorsque la sécrétion est stimulée par du calcium et de l'ATP comme dans le cas de la stimulation par le glucose. Ces résultats suggèrent que la protéine Syt 9 peut être nécessaire à des étapes  $\text{Ca}^{2+}$ /ATP-dépendantes lors de la sécrétion d'hormone différente de l'étape finale d'exocytose, qui dépend uniquement du  $\text{Ca}^{2+}$  dans les lignées insulino-sécrétoires.



**Figure r-6 : Introduction d'une mutation rendant les protéines Syt 9 résistantes au siRNA Syt 9**

(A) Quatre nucléotides sont mutés dans la séquence de Syt 9 au niveau de la région cible du siRNA Syt 9. Ces mutations sont localisées dans une région comprise entre les nucléotides 1520 et 1560 au niveau du domaine C2B. Ces mutations provoquent une résistance au siRNA Syt 9 et la protéine Syt 9 mutée est nommée Syt 9RNAi<sup>R</sup>. (B) Les cellules INS-1E sont co-transfectées avec des protéines cytosoliques Syt 9 Ct-eGFP RNAi<sup>R</sup> (domaine cytosolique de Syt 9 couplé à la eGFP et portant les quatre mutations) ou Syt 9Ct-eGFP (30%), et le vecteur pSuper Syt 9 (70%). Trois jours après transfection, les homogénats cellulaires sont déposés sur gel de polyacrylamide et révélés par immunoblot en utilisant un anticorps anti-Syt 9.

### III. IMPLICATION DES DOMAINES C2 DANS LA FONCTION DE SYT 9 PAR EXPRESSION DE PROTEINES MUTEES

D'après les résultats obtenus impliquant les domaines C2 dans la distribution sous-cellulaire de Syt 9 en présence de calcium (Résultats-Partie III), nous avons voulu étudier l'effet des mutations des domaines C2 utilisés dans l'étude précédente en partie III, sur l'exocytose des granules sécrétoires.

Nous avons donc introduit les mutations des domaines C2 dans la forme entière de la protéine Syt 9. Nous avons construit quatre vecteurs d'expression codant pour la protéine sauvage Syt 9, une protéine Syt 9 portant une mutation ponctuelle dans le domaine C2A (Syt 9 D<sub>145</sub>N), une protéine Syt 9 possédant deux mutations dans le domaine C2A (Syt 9 D<sub>197,199</sub>N) et une autre protéine Syt 9 mutée au niveau du domaine C2B (Syt 9 D<sub>330,332</sub>N). Ces différents vecteurs ont été co-transfectés avec le vecteur codant l'hGH et la sécrétion d'hGH a été stimulée par une dépolarisation au KCl dans les cellules HIT-T15. Les quantités d'hGH sécrétées et les concentrations intracellulaires en hormone sont mesurées. La surexpression de Syt 9 sauvage et l'expression des formes Syt 9 mutées dans les domaines C2 ne modifient pas la sécrétion d'hormone, stimulée par une dépolarisation au KCl dans les cellules HIT-T15, malgré une bonne expression et des taux d'expression comparables par rapport à la protéine endogène (résultats non montrés). Les protéines mutées n'agissent pas comme des dominants négatifs sur la sécrétion d'hormone et donc ne gênent pas l'action de la protéine Syt 9 endogène.

Par conséquent, nous nous sommes orientés vers une stratégie permettant d'étudier les mutations de Syt 9 sans la présence de la protéine endogène. Nous avons donc muté les quatre constructions pour rendre l'expression des protéines codées par ces vecteurs, insensibles au siRNA Syt 9. Nous avons inséré dans les constructions Syt 9, quatre mutations ponctuelles au niveau de quatre nucléotides localisés dans la séquence cible du siRNA Syt 9 (figure r-6A). Les mutations insérées vont produire des mésappariements entre l'ARNm correspondant aux protéines Syt 9 mutées et le siRNA Syt 9. Les mésappariements vont alors déstabiliser la liaison entre le siRNA Syt 9 et la séquence cible et ainsi réduire l'efficacité du siRNA Syt 9 sur la diminution de l'expression de Syt 9. Lorsque les mésappariements sont localisés au centre du siRNA et sont créés entre une adénosine et un uracile (U dans l'ARN donc T dans l'ADN), ils sont plus efficaces pour réduire l'efficacité du siRNA (Du et al., 2005). Nous avons donc inséré une substitution d'une thymidine par une cytosine et le remplacement de trois adénosines par des cytosines (figure r-6A). Ces mutations correspondent à celles insérées

dans le pSuper Syt9 mutated, qui nous a servi de contrôle dans l'étude de la diminution de l'expression de Syt 9 sur la sécrétion d'hormone. Ces mutations sont silencieuses, ce qui ne modifie pas la fonction des protéines Syt 9 portant ces substitutions. Ainsi, nous pourrions analyser, dans une même cellule, l'effet d'une protéine Syt 9 devenue résistante au siRNA Syt 9 alors que la protéine Syt 9 endogène ne sera plus exprimée car elle est sensible au siRNA Syt 9.

Afin de vérifier l'efficacité de ces mutations sur la résistance au pSuper Syt 9, nous avons inséré ces mutations dans une construction exprimant le domaine cytosolique de Syt 9 couplé à la protéine fluorescente eGFP (Syt 9Ct-eGFP). La nouvelle protéine exprimée par le vecteur d'expression ainsi obtenu, est nommée Syt9Ct-eGFP RNAi<sup>R</sup>. Nous avons donc cotransfecté les vecteurs codant pour les protéines Syt9Ct-eGFP RNAi<sup>R</sup> ou Syt 9Ct-eGFP avec le pSuper Syt 9 dans les cellules INS-1E. Après la transfection (72 heures), nous avons recueilli les homogénats de cellules et nous les avons déposés sur gel de polyacrylamide pour être ensuite analysés par immunoblot (figure r-6B). Dans les cellules coexprimant le siRNA Syt 9 et la protéine Syt 9Ct-eGFP, l'expression de cette protéine est quasiment nulle. A l'inverse, les cellules cotransfectées avec le pSuper Syt 9 et le vecteur exprimant la protéine Syt9Ct-eGFP RNAi<sup>R</sup>, présentent une forte expression de cette protéine par rapport à l'expression de la protéine Syt9Ct-eGFP. Les mutations insérées dans la protéine Syt9Ct-eGFP RNAi<sup>R</sup> rendent bien le siRNA Syt 9 inefficace sur l'expression de cette protéine par rapport à Syt9Ct-eGFP. La protéine Syt9Ct-eGFP RNAi<sup>R</sup> est résistante à l'effet du siRNA Syt 9.

Après avoir vérifié l'impact des mutations sur l'effet du siRNA Syt 9 sur les protéines Syt 9, nous avons inséré ces mutations dans le vecteur d'expression codant la protéine Syt 9 et les vecteurs exprimant les formes Syt 9 mutées dans les domaines C2. Dans les cellules INS-1E, les taux d'expression de la protéine Syt 9 et des formes Syt 9 mutées sont comparables et significativement supérieures à l'expression de la protéine Syt 9 endogène dans des cellules transfectées avec un vecteur vide (pCDNA<sub>3</sub>) (résultats non montrés, n=4 ; \*, p<0,05).

Par la suite, nous testerons l'effet de ces protéines sur la sécrétion stimulée par le glucose dans les cellules INS-1E en co-transfection avec le pSuper Syt9 et le vecteur codant l'hGH.

## Discussion

Nous avons étudié l'effet sur l'exocytose des LDCV, de l'inhibition de l'expression de Syt 9 par une approche d'ARN interférence, dans trois lignées insulino-sécrétoires. Nous avons montré que la diminution de l'expression de Syt 9 ne modifie pas la sécrétion d'hormone stimulée par une dépolarisation de la membrane plasmique par une solution de potassium dans les trois lignées insulino-sécrétoires. Ainsi, Syt 9 ne semble donc pas être le senseur calcique majoritaire de l'étape finale de l'exocytose des vésicules de sécrétion. Nous avons aussi montré que la réduction de l'expression de Syt 9 diminue la sécrétion d'hormone stimulée par le glucose ou par une solution de calcium et d'ATP, dans les cellules INS-1E. La diminution de l'expression de Syt 9 n'a donc d'effet que si l'exocytose est déclenchée par du calcium et de l'ATP. Pourtant dans la lignée INS-1E, Syt 9 a été décrit comme étant le senseur calcique de l'étape finale de l'exocytose  $Ca^{2+}$ -dépendante (Iezzi et al., 2005a; Iezzi et al., 2004).

Suite à une augmentation de la glycémie, la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  se fait en deux phases. La première phase de sécrétion est rapide et transitoire, et nécessite uniquement une augmentation du calcium intracellulaire puisque cette phase est maintenue lors de la sécrétion stimulée par le KCl (Rorsman et al., 2000; Rorsman and Renstrom, 2003). Cette libération d'hormone correspond à l'exocytose des vésicules rapidement relargables localisées à proximité de la membrane plasmique (pool RRP). La seconde phase de sécrétion est plus longue et nécessite l'élévation de la concentration calcique intracellulaire et un couplage métabolique produisant de l'ATP (Kennedy et al., 1998). Le calcium et l'ATP permettent le recrutement des vésicules au niveau du stock de réserve (pool RP) vers la membrane plasmique et l'exocytose des vésicules.

Selon les résultats que nous avons obtenus, Syt 9 ne semble pas être impliquée dans la première phase de sécrétion qui ne nécessite pas d'ATP mais uniquement le calcium. En effet, l'ATP est requis lors de la seconde phase de sécrétion pour mobiliser les vésicules du pool de réserve.

Aussi, la réduction de l'expression de Syt 9 provoque une forte diminution des quantités intracellulaires d'hormone. De même, nous avons observé que l'effet du siRNA dirigé contre Syt 9 inhibait le trafic vésiculaire des LDCV dans les cellules MIN6. En effet, dans les cellules n'exprimant plus de Syt 9, la distribution de la protéine VGF-eGFP présente

une réduction du nombre de vésicules fluorescentes et une accumulation de la fluorescence au niveau du TGN.

L'isoforme Syt 9 doit donc être impliquée dans le trafic vésiculaire post-TGN dans les cellules MIN6. Son rôle peut intervenir au niveau de plusieurs étapes : la stabilité des vésicules à la sortie de l'appareil de Golgi avant la fusion membranaire ou le recyclage des vésicules suite à l'exocytose.

L'hypothèse que Syt 9 intervienne dans le recyclage suite à l'exocytose des vésicules de sécrétion semble très probable puisque dans d'autres cellules sécrétoires de type RBL (cellules dérivées de mastocytes), Syt 9 est localisée dans le compartiment de recyclage par la voie endosomale (ERC, *endocytotic recycling compartment*). De plus, le domaine C2B de Syt 9 interagit avec l'AP2 qui est une protéine impliquée dans le mécanisme d'endocytose par la voie clathrine dépendante (Haberman et al., 2005). Nos expériences de mutagenèse dirigée des domaines C2 de Syt 9, ont également montré l'implication du domaine C2B dans la localisation de Syt 9 au niveau des endosomes dans les cellules insulino-sécrétoires (Grise et al., soumis). Il semble donc que Syt 9 soit impliquée dans le recyclage des vésicules. Ainsi, la diminution de l'expression de la protéine Syt 9 pourrait bloquer le recyclage vésiculaire entre la membrane plasmique et le réseau trans-golgien. Ceci induirait donc un défaut de matériel nécessaire à la formation des vésicules sécrétoires à la sortie de l'appareil de Golgi. Il serait donc intéressant de tester si la diminution de l'expression de Syt 9 par le siRNA Syt 9 modifie l'endocytose au niveau des cellules insulino-sécrétoires.

Nous chercherons également à déterminer si la perte de Syt 9 influence uniquement le trafic des vésicules de la sécrétion régulée ou aussi le trafic constitutif dans les cellules. Pour cela au laboratoire, une technique est utilisée pour observer le trafic vésiculaire constitutif à la sortie de l'appareil de Golgi (Jones et al., 2004). Les cellules sont transfectées avec un vecteur exprimant la protéine virale VSVG-eGFP (*vesicular stomatitis virus G protein*) thermosensible qui à 40°C s'accumule dans le réticulum endoplasmique et sort vers l'appareil de Golgi lorsque la température passe à 32°C (Presley et al., 1997). Ainsi, nous pourrions observer si la perte de l'expression de Syt 9 altère un mécanisme général du trafic vésiculaire ou est spécifique du trafic des LDCV et donc d'un type de sécrétion régulée.

Les résultats que nous avons obtenus dans les différentes lignées et ceux décrits dans les cellules INS-1E (Iezzi et al., 2005a; Iezzi et al., 2004), sont en contradiction sur le rôle de senseur calcique de l'exocytose. Nos résultats suggèrent que Syt 9 est impliquée dans l'exocytose mais qu'elle ne serait pas le seul senseur calcique des LDCV alors que les

données publiées envisagent un rôle prépondérant de Syt 9. Une hypothèse pour expliquer ces divergences serait que les trois lignées insulino-sécrétoires ne se comportent pas de manière identique et que le rôle de Syt 9 est spécifique de la lignée cellulaire. Ainsi, dans les cellules MIN6 et HIT-T15, la redondance fonctionnelle des isoformes Syt 1 et Syt 2 ne permettrait pas d'observer une diminution de la sécrétion suite à la perte de Syt 9. Néanmoins, dans les cellules INS-1E, la présence des isoformes Syt 1 et Syt 2 a aussi été montrée ainsi que le rôle fonctionnel de ces deux protéines dans l'exocytose des vésicules lors de la sécrétion (Lang et al., 1997a). Ainsi, il serait intéressant de déterminer si l'effet de la diminution de l'expression de Syt 9 sur le trafic des LDCV dans les cellules INS-1E est identique à celui observé dans la lignée de cellules MIN6.

Parallèlement à l'étude de l'implication de Syt 9 dans le recyclage, nous allons poursuivre la détermination du rôle des domaines C2 de Syt 9 dans l'exocytose. Les constructions de protéines Syt 9 résistantes à l'effet du siRNA va ainsi nous permettre de réaliser cette étude. Dans un premier temps, nous déterminerons si la protéine Syt 9 résistante au siRNA Syt 9 restaure la diminution de la sécrétion suite à la stimulation par le glucose dans les cellules transfectées avec le vecteur pSuper Syt 9. Puis, nous pourrons analyser les effets des mutations des domaines C2 sur la sécrétion régulée par le glucose sans la présence de Syt 9 endogène. Une collaboration avec l'équipe de P. Rorsman à Oxford est en cours pour étudier l'effet des protéines Syt 9 mutées dans les domaines C2 et résistantes au siRNA Syt 9, sur la capacitance des cellules stimulées par une dépolarisation au KCl.





## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**



Au cours de ce travail, nous avons défini et caractérisé le senseur calcique de l'exocytose de l'insuline.

Dans la littérature trois isoformes de synaptotagmines étaient indiquées comme pouvant être responsables de la sécrétion de l'insuline en réponse à une augmentation du calcium dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques. Pour déterminer leur rôle précis dans l'exocytose de l'insuline, nous avons localisé les protéines endogènes Syt 7, Syt 8 et Syt 9 dans les lignées insulino-sécrétoires.

#### *Les synaptotagmines 7 et 8 :*

Dans un premier temps, nous avons montré que Syt 7 n'est pas localisée sur les granules de sécrétion contenant l'insuline mais au niveau des endosomes dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques. L'application de protéines recombinantes Syt 7 dans les lignées insulino-sécrétoires inhibe fortement la sécrétion d'insuline (Gut et al., 2001). Il se pourrait donc que Syt 7 piège des effecteurs de la fusion membranaire et ainsi agisse indirectement sur l'exocytose des vésicules de sécrétion contenant l'insuline. En effet, Syt 7 pourrait être impliquée dans le recyclage vésiculaire puisqu'elle est localisée sur les endosomes et dans ce cas la protéine recombinante empêcherait le recyclage des vésicules et par voie de conséquence la formation des vésicules de sécrétion.

Dans un second temps, la production d'un anticorps spécifique dirigé contre Syt 8 a permis de déterminer l'existence de deux variants d'épissage de Syt 8, l'un localisé au niveau du réseau trans-golgien et l'autre correspondant à une protéine soluble cytoplasmique dans les cellules insulino-sécrétoires. Syt 8 n'est donc pas localisée sur les LDCV et en plus, elle ne possède pas les particularités d'un senseur calcique, ce qui suggère qu'elle n'est pas impliquée dans l'exocytose de l'insuline en tant que senseur calcique. L'inhibition de la sécrétion d'insuline suite à l'application de la protéine Syt 8 recombinante dans les cellules insulino-sécrétoires perméabilisées, reflète probablement de nouveau la séquestration de molécules nécessaires à la fusion membranaire par la protéine recombinante (Gut et al., 2001).

D'après les nouvelles données obtenues sur ces deux isoformes (figure c-1), nous pouvons conclure que Syt 7 et Syt 8, pourraient intervenir dans des étapes du trafic vésiculaire au niveau du trafic post-golgien ou au niveau du recyclage des vésicules via les endosomes dans les cellules insulino-sécrétoires.

isoforme Syt	Expression/ Localisation			Interaction		
	Cellule $\beta$ primaire	Lignées insulino-sécrétoires	îlots pancréatiques	phospholipides	SNARE	
Syt 1	$\emptyset$	LDCV/SLMV	$\emptyset$	+		+
Syt 2	$\emptyset$	LDCV/SLMV	$\emptyset$	+		+
Syt 9	LDCV	<b>LDCV/SLMV</b>	+	+		+
Syt 3	$\emptyset$	membrane plasmique (MP)	MP cellules $\delta$	+		+
Syt 5	$\emptyset$	LDCV	LDCV dans cellules $\alpha$	+		+
Syt 6	+ (Northern)	?	+	+		+
Syt 10	?	?	?	+		+
Syt 4	TGN	TGN	TGN cellules $\alpha$ et $\beta$	-		+
Syt 11	?	?	?	-		?
Syt 12	?	?	?	-		-
Syt 13	?	?	?	-		-
Syt 14	?	?	?	?		?
Syt 15	?	?	?	?		?
Syt 16	?	?	?	?		?
Syt 7	+	<b>Endosomes</b>	+	+		+
Syt 8	+ (Northern)	<b>Appareil de Golgi/Cytosol</b>	+	-		+

**Figure c-1 : Données actuelles sur l'expression et la localisation des isoformes des Syt dans le pancréas endocrine**

Tableau récapitulatif des données récentes sur l'expression et la localisation des différentes isoformes des synaptotagmines dans les cellules  $\beta$  primaires et les lignées dérivées et sur les îlots pancréatiques. Les caractéristiques biochimiques (liaisons aux phospholipides et aux protéines SNARE) sont aussi indiquées dans les deux dernières colonnes. Les informations apportées par ce travail sont écrites en rouge.

$\emptyset$ : pas d'expression, ? : pas déterminé, + : expression/interaction positive, - : pas d'interaction

*La synaptotagmine 9 :*

Une autre partie de ce travail a concerné d'une part, l'étude des interactions *in vivo* de Syt 9 avec les membranes en réponse à une augmentation de calcium et d'autre part, l'étude de la fonction de cette isoforme dans les lignées insulino-sécrétoires. Les résultats obtenus dans ces deux études, nous permettent de conclure que Syt 9 n'intervient pas uniquement dans l'étape finale de l'exocytose de l'insuline dans les cellules insulino-sécrétoires. Il semblerait que l'isoforme Syt 9 joue un rôle dans la stabilité des vésicules avant la fusion et/ou dans le recyclage des vésicules.

*Syt 9 : senseur calcique de l'étape finale de l'exocytose*

Dans un premier temps, nous avons étudié dans trois lignées insulino-sécrétoires différentes, la fonction de Syt 9 dans l'exocytose de l'insuline. Syt 9 a une localisation au niveau des vésicules à cœur dense contenant l'insuline dans les cellules INS-1E et les cellules primaires  $\beta$ -pancréatiques (Iezzi et al., 2005a; Iezzi et al., 2004). Dans deux autres lignées insulino-sécrétoires, MIN6 et HIT-T15, nous avons retrouvé cette localisation sur les granules de sécrétion. Par fractionnement sur gradient de saccharose, Syt 9 est également retrouvée dans les fractions correspondant aux SLMV. Cependant dans les cellules endocrines, ces fractions peuvent aussi représenter le compartiment endosomal. Nous avons aussi montré dans ces deux lignées que l'inhibition de l'expression de Syt 9 ne modifie pas la sécrétion régulée par le calcium (stimulation au KCl). De même, dans les cellules INS-1E, la perte de l'expression de Syt 9 ne réduit pas la sécrétion d'hormone suite à une dépolarisation de la membrane au KCl. Cependant, une diminution de la sécrétion d'hormone lors d'une stimulation par le glucose ou par le calcium supplémenté en ATP est observée dans ces cellules. Il semble donc que la diminution de la sécrétion due à l'absence de Syt 9, s'exprime uniquement lorsque la mobilisation des vésicules de réserve est mise en jeu. Syt 9 serait donc impliquée dans la seconde phase de libération de l'hormone qui met en jeu ces vésicules de réserve.

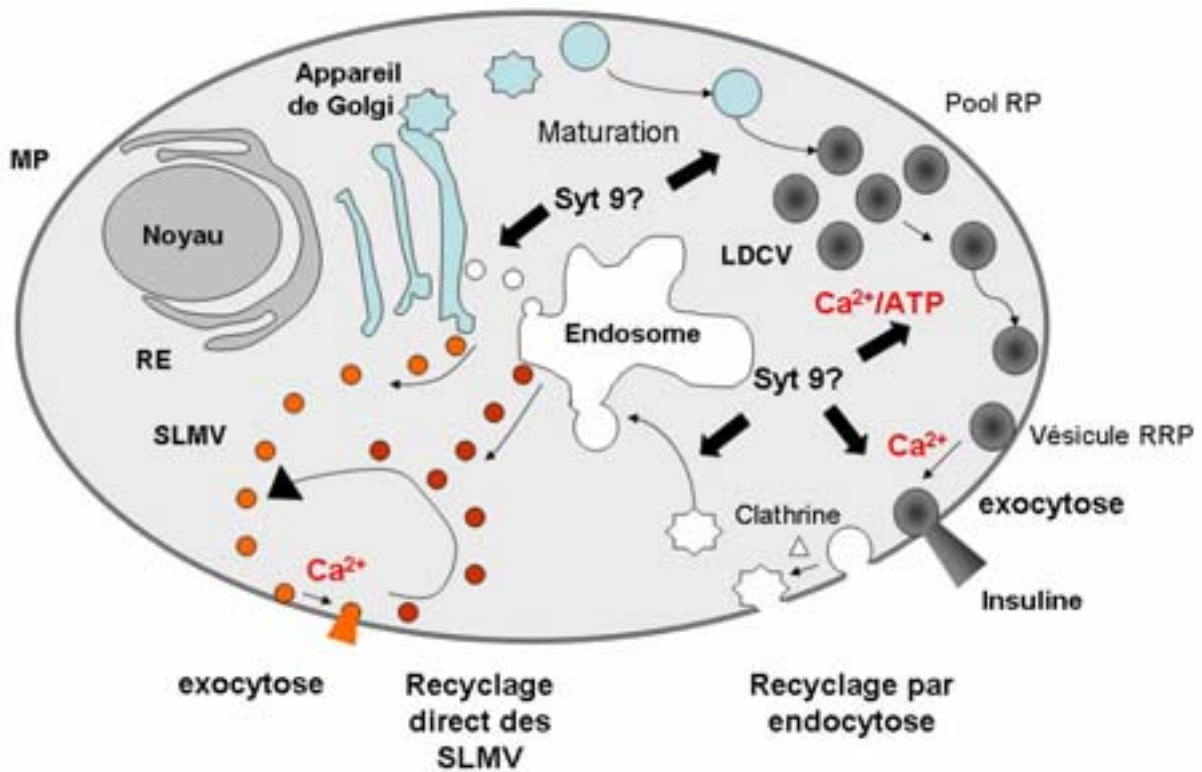
Les résultats obtenus suite à une dépolarisation au KCl dans les lignées MIN6 et HIT-T15 sont différents de l'effet du tolbutamide observé au niveau des îlots pancréatiques transfectés avec le siRNA Syt 9 (Iezzi et al., 2005a). Le tolbutamide est un inhibiteur des canaux potassium ATP-dépendants et lorsque les îlots sont stimulés par cet agent, la sécrétion

d'insuline est fortement inhibée. Ces résultats suggèrent que Syt 9 est le senseur calcique majeur de l'exocytose des vésicules larges à cœur dense. Cependant, la stimulation de la PKA restaure totalement la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose, ce qui suggère que l'exocytose d'un pool de vésicules n'est pas modifiée. Il semblerait donc que Syt 9 soit impliquée comme senseur calcique de l'exocytose de l'insuline mais probablement pas de tous les pools de vésicules de sécrétion. En effet, dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques, deux pools de vésicules relargables situées à proximité de la membrane sont identifiés : les vésicules HCSP qui fusionnent avec la membrane à très basse concentration calcique et les vésicules RRP qui nécessitent une concentration calcique plus élevée pour déclencher leur fusion. La PKA permet le recrutement de ces deux pools à partir des vésicules de réserve et augmente majoritairement la taille du pool HCSP. Ainsi comme l'inhibition de l'expression de Syt 9 ne modifie plus l'exocytose lorsqu'elle est stimulée par la PKA, Syt 9 pourrait donc être exclusivement le senseur calcique de ce pool. Lors du trafic post-golgien des vésicules à cœur dense, les vésicules subissent des étapes de maturation qui correspondent soit à la perte des composants des vésicules, soit à des modifications post-traductionnelles de ces composants. Il se pourrait donc que Syt 9 ne soit pas présente sur tous les pools de vésicules ou qu'elle subisse des modifications de type phosphorylation, palmitoylation ou glycosylation qui modifient sa fonction.

Pour vérifier l'hypothèse que Syt 9 est le senseur calcique d'un seul pool de vésicules, il faudrait mettre en évidence un pool de vésicules d'insuline qui n'expriment pas la protéine Syt 9 à leur surface, ou déterminer la cinétique de la sécrétion à haute résolution afin de déterminer la contribution de chaque pool.

L'étude fonctionnelle de Syt 9 dans les trois lignées différentes montre que Syt 9 n'est pas le senseur calcique majeur de la sécrétion d'insuline, c'est-à-dire qu'une autre isoforme ou une autre protéine, non identifiées pourrait également intervenir dans l'étape finale de l'exocytose des vésicules sécrétoires. De plus, Syt 9 semble impliquée dans des étapes plus précoces dans l'exocytose puisqu'elle intervient lors de la mobilisation des vésicules de réserve. En effet, nous avons montré que l'inhibition de l'expression de cette protéine diminue fortement la quantité intracellulaire en hormone et modifie le trafic vésiculaire. L'absence de Syt 9 dans les cellules insulino-sécrétoires MIN6 induit une diminution du nombre de vésicules LDCV et une accumulation des protéines vésiculaires au niveau du réseau trans-golgien. Pour expliquer ces résultats, nous proposons deux hypothèses : ou Syt 9





**Figure c-2 : Trafic vésiculaire des LDCV et des SLMV dans une cellule  $\beta$ -pancréatique et intervention de Syt 9**

Dans une cellule  $\beta$ , les granules de sécrétion contenant l'insuline, les LDCV (*large dense-core-vesicle*) sont formés par bourgeonnement à la sortie de l'appareil de Golgi. Les vésicules immatures subissent des étapes de maturation qui aboutissent à la formation d'un stock de vésicules matures contenant l'insuline, appelé le pool de réserve (RP). Plusieurs étapes nécessitant du calcium et de l'ATP vont permettre d'amener les vésicules de réserve à proximité de la membrane où elles constitueront le pool de vésicules rapidement relargables (RRP). Suite à une élévation de la concentration calcique intracellulaire, les vésicules RRP fusionnent avec la membrane plasmique et libèrent leur contenu par exocytose. Le recyclage des LDCV passe par l'endocytose clathrine-dépendante puis les vésicules fusionnent avec les endosomes. Des vésicules transitent du compartiment endosomal vers l'appareil de Golgi. Dans les cellules  $\beta$ , d'autres vésicules, les SLMV (*synaptic like microvesicles*) bourgeonnent de l'appareil de Golgi ou des endosomes, puis sous l'effet d'une augmentation du calcium intracellulaire, fusionnent avec la membrane plasmique. Après la libération de leur contenu, ces vésicules peuvent être recyclées indépendamment de l'appareil de Golgi. Syt 9 intervient dans l'étape finale de l'exocytose  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante et pourrait aussi intervenir dans des étapes plus précoces ou dans le recyclage par les endosomes.



intervient dans le recyclage des constituants des membranes et/ou Syt 9 permet la stabilité des vésicules avant l'exocytose.

*Syt 9 intervient dans le recyclage via les endosomes*

Syt 9 est impliquée dans le recyclage par les endosomes, des vésicules et des protéines membranaires de la machinerie de l'exocytose. En effet, une mutation du domaine C2B de Syt 9 empêche la localisation de la protéine Syt 9 C2AB-eGFP au niveau des endosomes. Cette observation suggère que Syt 9 se localise sur les endosomes. De plus, elle pourrait aussi être impliquée dans le recyclage par endocytose. D'ailleurs dans une lignée de cellule sécrétoires dérivée des mastocytes (RBL), Syt 9 est localisée dans le compartiment endosomal de recyclage (ERC) et elle régule le trafic vésiculaire entre ce compartiment ERC et la membrane plasmique (Haberman et al., 2003). Dans ce type cellulaire, la localisation de Syt 9 dans le compartiment ERC est précédée d'une localisation de Syt 9 à la membrane plasmique. Syt 9 est alors phosphorylée par la PKC ce qui déclenche l'internalisation de Syt 9 vers le compartiment ERC (Haberman et al., 2005). Ainsi, dans les lignées insulino-sécrétoires, l'internalisation de Syt 9 nécessite la présence du domaine C2B fonctionnel qui interagit probablement avec des protéines impliquées dans l'endocytose telle que AP-2. Cette interaction entre le domaine C2B et AP-2, a été mise en évidence dans les cellules RBL (Haberman et al., 2005). Ainsi, l'absence de Syt 9 induirait un défaut de matériel (protéines et lipides) au niveau du TGN qui bloquerait la formation des vésicules sécrétoires et donc diminuerait le stock de vésicules de réserve.

De plus, plusieurs études ont montré l'implication de Syt 1 dans le recyclage par endocytose des vésicules synaptiques (Poskanzer et al., 2006). Syt 9 pourrait donc tenir un rôle similaire à Syt 1. En effet, le recyclage des vésicules synaptiques passe par un recyclage par endocytose, mécanisme qui est commun aux LDCV dans les cellules endocrines. Cependant, le recyclage des vésicules synaptiques ne passe pas obligatoirement par l'appareil de Golgi comme pour les SLMV (figure c-2).

*Syt 9 intervient dans le maintien des vésicules avant la fusion*

Syt 9 pourrait intervenir aussi dans des étapes plus précoces que la fusion membranaire. Une étude récente vient de mettre en évidence l'implication de la région polybasique du domaine C2B de Syt 1 dans les étapes préfusionnelles (Loewen et al., 2006). La mutation de cette région induit dans les synapses de drosophile une diminution importante du nombre de vésicules synaptiques sans perturber les capacités d'exocytose des vésicules. La réduction du nombre de vésicules n'est pas due à une diminution de l'endocytose. Par analogie, Syt 9 pourrait aussi être impliquée dans la stabilité des vésicules avant la fusion.

L'ensemble de ces résultats obtenus sur la fonction de Syt 9 dans l'exocytose régulée par le calcium, et sur les caractéristiques de liaison aux membranes des domaines C2 mutés de Syt 9, nous permettent de proposer un modèle d'action de Syt 9 dans la sécrétion d'insuline dans les cellules  $\beta$ . Syt 9 pourrait être impliquée au niveau de trois étapes distinctes lors du trafic vésiculaire dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques (figure c-2) : la stabilité des vésicules en sortie de l'appareil de Golgi, l'exocytose d'un pool spécifique de vésicules et le recyclage des vésicules par l'intermédiaire de son domaine C2B.

*Les perspectives à court et à long terme:*

Il serait intéressant de déterminer si l'absence de Syt 9 altère la voie de sécrétion régulée ou également la sécrétion constitutive. Pour cela, nous pouvons suivre le trafic de vésicules spécifiques de la voie de la sécrétion constitutive, marquées par la protéine VSVG couplée à la GFP, dans des cellules transfectées avec le pSuper Syt9. De même, nous pourrions utiliser les constructions résistantes à l'effet du siRNA, pour restaurer le trafic des LDCV et ainsi en utilisant les protéines Syt 9 mutées dans les domaines C2 et résistantes au siRNA Syt 9, déterminer le domaine nécessaire à cette fonction.

Un deuxième axe de travail consisterait à identifier l'étape du trafic qui est altérée par l'absence de Syt 9. En effet, afin de définir le rôle de Syt 9 dans la stabilisation des vésicules ou le recyclage par endocytose, nous envisageons de mesurer l'endocytose dans les cellules  $\beta$  présentant une diminution de l'expression de Syt 9, en suivant par exemple l'internalisation de la transferrine marquée. Par cette même approche, nous pourrions aussi mesurer le recyclage à la sortie des endosomes et déterminer l'effet des mutations des domaines C2 sur

l'endocytose dans des cellules transfectées avec les protéines Syt 9 mutées dans les domaines C2.

Les données publiées montrent une interaction *in vitro* entre la protéine t-SNARE, SNAP-25 et Syt 9 (Rickman et al., 2004b; Tucker et al., 2003; Zhang et al., 2002), qui n'a jamais été retrouvée *in vivo* par immunoprécipitation (Bhalla et al., 2005; Shin et al., 2004). Des approches expérimentales différentes permettraient peut-être de clarifier ce point. La technique du FRET ou l'utilisation de crosslinker dans des cellules perméabilisées à la Streptolysine-O dans les lignées cellulaires  $\beta$  pendant la sécrétion d'insuline, pourraient être envisagées.

Il serait également intéressant de rechercher l'interaction de Syt 9 avec d'autres protéines SNARE impliquées dans le recyclage des membranes telle que la syntaxine 13 qui forme un complexe SNARE avec VAMP2 et SNAP-25 lors du recyclage par les endosomes (Aikawa et al., 2006a; Aikawa et al., 2006b).

En conclusion, le rôle précis des Syt et surtout de Syt 9 semble être plus complexe qu'initialement décrit. Ces observations reflètent la complexité des étapes de l'exocytose et du trafic post-golgien dans les cellules en général. En effet, le trafic entre les LDCV et les endosomes ainsi que le devenir de la machinerie d'exocytose est encore peu connu et aucune donnée n'a été publiée sur les cellules  $\beta$ . Les différentes étapes du trafic vésiculaire restent encore à être élucidées. Ces données couplées à l'étude des fonctions des protéines impliquées dans le trafic vésiculaire, comme par exemple Syt 9, permettraient d'établir un modèle du cycle exo-endocytose dans les cellules  $\beta$ .



# **MATERIEL ET METHODES**



## I. MATERIEL BIOLOGIQUE

### A. Souches Bactériennes

Deux souches de bactéries *Escherichia coli* (E.coli) ont été utilisées au cours de ce travail :

- La souche XL1-Blue (Stratagene) pour le clonage et la propagation d'ADN plasmidique dont le génotype est : *recA1 endA1 gyr96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tetr)*].
- La souche BL21 (DE3) pLysS (Stratagene) pour la production des protéines recombinantes; de génotype : E.coli B, F<sup>-</sup> *dcm ompT hsdSB<sub>(r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>-)</sub>* gal λ(DE3) [pLysS Cam<sup>r</sup>]. Cette souche présente une délétion du gène *lon* codant pour une protéase majoritaire, et une délétion du gène *ompT* codant pour une protéase membranaire. De plus, cette bactérie comporte, intégré à son génome, le gène codant pour l'ARN polymérase du phage T7. Elle porte aussi le plasmide pLysS, capable de coder pour une enzyme (le lysozyme T7) inhibitrice de l'ARN polymérase. Ce système permet de contrôler l'induction de l'expression de la protéine.

### B. Lignées cellulaires

Trois lignées de cellules adhérentes de mammifère ont été employées au cours de ce travail. Ces cellules sont immortalisées par transformation et sont capables de synthétiser, stocker puis sécréter l'insuline suite à un stimulus.

- La lignée HIT-15 (ATCC n° CRL-1777), dérivée d'une culture primaire de cellules β issues d'un îlot de Langherans de hamster.
- Le clone m9 de la lignée MIN6 qui est elle-même dérivée d'une culture primaire de cellules β issues d'un îlot de Langherans de souris. Ces cellules nous ont été généreusement données par le Dr S. Seino (Chiba, Japon) (Minami et al., 2000).

Ces deux lignées cellulaires sont immortalisées par transformation par l'antigène T du virus SV40.

- La lignée INS-1E, dérivée d'un insulinome de rat induit par radiation (Asfari et al., 1992). Ces cellules nous ont été généreusement données par le Dr C. Wollheim (Merglen et al., 2004).

### **C. Vecteurs de clonage**

Les cartes de restriction des vecteurs plasmidiques vides utilisés pour effectuer les sous-clonages sont présentées sur la figure m-1. A partir de ces vecteurs, différentes constructions ont été réalisées et sont présentées dans le tableau m-1. D'autres constructions plasmidiques utilisées, nous ont été généreusement fournies et sont répertoriées dans le tableau m-2.

### **D. Anticorps**

Les anticorps primaires et secondaires utilisés en immunofluorescence et en immunodétection durant ce travail sont détaillés dans les tableaux m-3, m-4, m-5 et m-6.

La composition des différents tampons utilisés est indiquée en page 197.



## II. MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURE

### A. Bactéries

#### 1. Milieu pour culture de bactéries

Le milieu de culture LB (Luria Bertani) pour bactéries est stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

Les antibiotiques utilisés pour sélectionner les bactéries résistantes, sont stérilisés par filtration sur membrane de nylon 0,22 µm (Millipore) et sont ajoutés si besoin au milieu après stérilisation, à une concentration finale de : 30 µg/ml pour la kanamycine, 100 µg/ml pour l'ampicilline et le chloramphénicol. Ainsi, les milieux LB solides sont dit sélectifs car seules les bactéries exprimant la résistance à l'antibiotique du milieu pourront pousser.

#### 2. Conditions de culture et de conservation des bactéries

Les bactéries sont cultivées à 30°C ou à 37°C selon leur utilisation (respectivement, production de bactéries recombinantes ou propagation de vecteurs). Les cultures en milieu liquide sont faites sous agitation régulière (230 rpm) avec un rapport permettant une bonne oxygénation des cultures (rapport volume culture/ volume total de 1/5).

Les bactéries transformées ou non sont conservées à -80°C dans du glycérol 20%. Le stock glycérol est réalisé à partir d'une culture en phase exponentielle.

### B. Cellules de mammifères

#### 1. Milieux pour la culture des cellules de mammifères

La composition des milieux utilisés pour cultiver les cellules de mammifères est variable selon la lignée :

- HIT-T15 : RPMI 1640 (Invitrogen) supplémenté en sérum de veau fœtal (Invitrogen) 10% (v/v), acide sélénieux (Sigma) 0,1µM, L-glutamine (Invitrogen) 2mM, glutathion réduit (Sigma) 32,5 µM, pénicilline (Invitrogen) 50 unités/ml et streptomycine (Invitrogen) 50 µg/ml.

- MIN6 : DMEM (Invitrogen) supplémenté en sérum de veau fœtal 10% (v/v), bicarbonate de sodium (Invitrogen) 45mM, pénicilline 50 unités/ml, streptomycine 50 µg/ml et β-mercaptoéthanol (Sigma) 50 µM.
- INS-1E : RPMI 1640 supplémenté en sérum de veau fœtal 5% (v/v), β-mercaptoéthanol 50 µM, pyruvate 1mM, L-glutamine 2mM, HEPES pH 7,3 10 mM, pénicilline 50 unités/ml et streptomycine 50 µg/ml.

## 2. Conditions de culture et de conservation des cellules de mammifères

La culture des lignées HIT-T15 et MIN6 est réalisée en flasque de 75 cm<sup>2</sup>, plaque ou boîte de Pétri de marque Nunc, celle de la lignée INS-1E dans des plastiques de marque Falcon. Les cellules sont cultivées à 37°C, sous 5% de dioxyde de carbone et en atmosphère humide. Lorsque les cultures sont proches de la confluence (80 % de confluence), les cellules sont récoltées, diluées et réensemencées de la manière suivante : les cellules en flasque sont lavées avec du PBS sans calcium/magnésium (Invitrogen), puis elles sont décollées par une incubation dans une solution de trypsine (Trypsine 0,5 g/l, Invitrogen) à 37°C pendant quelques minutes (1-3 minutes). Après addition de milieu pour stopper l'effet de la trypsine, les cellules sont récupérées, centrifugées et resuspendues dans du milieu de culture. Après comptage, les cellules sont ensemencées dans des flasques à la densité de 3.10<sup>6</sup> cellules/75cm<sup>2</sup> pour les HIT-T15 et les INS-1E, et de 2,5.10<sup>6</sup> cellules/75cm<sup>2</sup> pour les MIN6. Les milieux de culture des flasques sont changés toutes les 48 heures.

Selon les expériences menées, les cellules sont ensemencées comme suit :

- 50 000 cellules dans 750 µl de milieu pour une plaque de 24 puits (diamètre 16 mm) pour les lignées HIT-T15 et MIN6, ou 75 000 cellules pour la lignée INS-1E.
- 70 000 ou 200 000 cellules HIT-T15 ou MIN6 dans 3 ml de milieu pour une boîte de Pétri (diamètre 35 mm).

Pour les expériences de perméabilisation des cellules, l'adhérence des cellules doit être renforcée. Pour cela, les cellules sont ensemencées dans des puits préalablement saturés à la Polylysine (Sigma) suivant les recommandations du fournisseur. De même, pour les expériences d'immunocytochimie et de vidéomicroscopie, les cellules sont ensemencées sur

des lames de verre (12 mm et 35 mm de diamètre respectivement dans les plaques 24 puits et les boîtes de pétri).

Régulièrement des cellules sont congelées à une concentration de  $1.10^6$  cellules/ml, pour constituer un stock de cellules réutilisables. Les cellules sont remises en suspension dans un milieu de conservation constitué de sérum de veau fœtal (90% v/v) et de diméthylsulfoxyde (DMSO) (10% v/v). Elles sont congelées lentement en les plaçant dans un bain d'isopropanol à  $-80^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures, puis conservées dans de l'azote liquide pendant plusieurs années.

La remise en culture de cellules congelées (condition ci-avant) se fait après décongélation rapide à  $37^{\circ}\text{C}$  et centrifugation de la suspension cellulaire, afin d'éliminer toutes traces de DMSO. Les cellules sont ensuite mises en culture dans le milieu et les conditions décrites précédemment.

### III. BIOLOGIE MOLECULAIRE

#### A. Digestion et ligation des ADN

##### 1. Digestion de l'ADN

Les réactions de digestion des ADN plasmidiques sont réalisées avec différentes endonucléases provenant de Roche Diagnostics ou New England Biolabs (NEB). Le protocole couramment utilisé est le suivant :

- 0,1 à 1µg ADN
- 2 µl tampon de restriction spécifique à l'enzyme (10X)
- 0,2 à 1 unité d'endonucléase
- complété à 20 µl (qsp 20 µl) par de l'eau stérile.

Le mélange est incubé à une température permettant l'activité optimale de l'enzyme pendant une à deux heures.

##### 2. Ligation de l'ADN

Pour les ligations, 50 à 100 ng de plasmide receveur et d'insert (1 :3) sont incubés une nuit à 16°C en présence d'une unité d'enzyme T4 DNA Ligase (New England Biolabs), dans 1/10<sup>ème</sup> de tampon de ligation fourni avec la ligase (volume final de 10 à 20µl).

#### B. Amplification d'une séquence par PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permet d'amplifier *in vitro* une séquence d'ADN plasmidique. L'amplification de la matrice d'ADN se fait à l'aide d'un couple d'oligonucléotides spécifiques (tableau m-7) utilisés comme amorces et d'une ADN polymérase ADN-dépendante. Les oligonucléotides sont conservés à -20°C à une concentration de 0,5 mM dans du TE 10:1. La réaction de PCR est effectuée dans un thermocycleur (GeneAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystems).

Le protocole utilisé est le suivant :

- 10 à 50 ng d'ADN plasmidique
- 300 nM de chaque amorce
- 200  $\mu$ M de chaque dNTP
- 1 unité d'ADN polymérase
- 5  $\mu$ l de tampon commercial (10X)
- qsp 50  $\mu$ l d'eau stérile.

L'ADN polymérase employée est la Pfu Turbo (Stratagene). La température de dénaturation est de 94°C pendant 1 minute, quels que soient les ADN, celle d'élongation de 72°C est spécifique de la polymérase utilisée et la durée de la phase d'élongation est de 1 minute. La température d'hybridation est calculée en fonction de la température de fusion du couple d'amorces utilisé et cette étape dure 40 secondes. Après 30 cycles d'amplification, la PCR se termine par une élongation de 7 minutes à 72°C.

Une fraction (1/10<sup>ème</sup>) du mélange réactionnel est analysée par électrophorèse sur gel d'agarose pour contrôler la qualité de l'amplification (cf paragraphe suivant). Puis, les produits de PCR sont purifiés à l'aide du kit « *Wizard<sup>®</sup> Plus SV PCR Clean-up System* » (Promega).

## **C. Séparation et purification des acides nucléiques par électrophorèse**

### **1. Migration des acides nucléiques**

Les gels d'agarose sont composés de 0,8 à 2% d'agarose dilué dans du tampon TBE et de bromure d'éthidium (BET) à la concentration de 0,2  $\mu$ g/ml. Le BET est une molécule qui s'intercale entre les bases des acides nucléiques, permettant de les visualiser sous U.V. La quantité d'agarose utilisée dépend de la taille des ADN à séparer. Avant migration, les solutions d'acides nucléiques sont mélangées à un tampon de charge, puis déposées dans le gel. La migration est réalisée sous un courant électrique de 60 volts, dans du TBE. Les ADN sont visualisés par exposition du gel aux ultraviolets (302nm).

Les gels sont photographiés à l'aide d'une caméra CCD couplée à un programme d'analyse d'images Fluorchem v2.00 (Alpha Innotech Corp.).

## 2. Extraction des acides nucléiques à partir d'un gel d'agarose

L'extraction des fragments d'ADN après migration en gel d'électrophorèse est réalisée selon le protocole promega (kit « *Wizard® Plus SV Gel Clean-up System* »). La concentration d'ADN extrait est estimée après migration sur gel d'agarose d'un dixième de la solution par comparaison de l'intensité des bandes avec celles d'un ADN utilisé comme référence de taille et de quantité : le « phage  $\lambda$  *HindIII* » (Invitrogen).

### D. Transformation des bactéries *E.coli* compétentes

#### 1. Préparation des bactéries compétentes

##### 1.1. Les bactéries chimio-compétentes

Avant d'être utilisées pour la transformation, les bactéries doivent être rendues chimio-compétentes. Pour cela, une culture de bactéries BL21 ou XL1-Blue est incubée à 37°C sous agitation (230rpm) jusqu'à une densité optique à 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) d'environ 0,6. Les bactéries subissent ensuite un traitement au chlorure de calcium ( $CaCl_2$ ). Pour cela, 20 ml de bactéries sont récoltées par centrifugation (5 minutes, 5000g, 4°C), puis le culot est resuspendu avec 10 ml de  $CaCl_2$  à 100 mM froid, et incubé environ 30 minutes sur glace. Les bactéries sont de nouveau centrifugées (5 minutes, 5000g, 4°C), et le culot resuspendu avec 2ml de  $CaCl_2$  froid 100mM.

Après addition de 1,3 ml de glycérol 50% stérile froid, la suspension bactérienne est aliquotée, congelée dans l'azote liquide et conservée à -80°C. La compétence est testée avant utilisation en comptant les colonnies obtenues après transformation d'1 $\mu$ g d'ADN (de l'ordre de 4 à 5.10<sup>6</sup> colonies/ $\mu$ g d'ADN plasmidique).

##### 1.2. Les bactéries électro-compétentes

Les bactéries XL1-Blue peuvent également être électro-transformées si elles ont subi un traitement adéquat. Ainsi, lorsque la culture bactérienne (volume de 500 ml) a atteint une  $DO_{600nm}$  d'environ 0,6, elle est centrifugée (15 minutes, 4000g, 4°C) puis reprise dans 500 ml d'eau stérile froide. Elles sont de nouveau centrifugées (15 minutes, 4000g, 4°C) et remises en suspension dans 250 ml d'eau stérile froide. Enfin, après une nouvelle centrifugation (15

minutes, 4000g, 4°C), le culot bactérien est resuspendu par 10 ml de glycérol 10% stérile froid. Après une dernière centrifugation (15 minutes, 4000g, 4°C) les bactéries sont resuspendues dans 1 ml de glycérol 10% stérile froid, aliquotées, congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C. La compétence doit être de l'ordre de  $5.10^8$  colonies/ $\mu$ g d'ADN plasmidique.

## **2. Transformation des bactéries**

### 2.1. Chimio-transformation

200  $\mu$ l de bactéries chimio-compétentes sont ajoutées à la préparation d'ADN (100 ng d'ADN). Le mélange est incubé 40 minutes dans la glace. Un choc thermique est réalisé en plaçant le mélange 2 minutes à 42°C pendant, puis 2 minutes sur la glace. Après addition de 1 ml de milieu LB, les bactéries sont incubées une heure à 37°C sous agitation (230 rpm) pour permettre l'expression de la résistance à l'antibiotique puis elles sont étalées sur milieu sélectif solide.

### 2.2. Electro-transformation

Dans une cuve à électroporation froide de 0,2 cm, 40  $\mu$ l de bactéries électro-compétentes sont mélangés à 100 pg d'ADN ou  $1/10^{\text{ème}}$  d'une ligation. La cuve est placée dans un *Gene Pulser*<sup>®II</sup> (Bio-Rad) et les bactéries soumises à un pulse électrique (2,5 kV, 25  $\mu$ F, 200 $\Omega$ ). Un ml de milieu LB est ajouté immédiatement aux cellules puis elles sont incubées à 37°C pendant une heure, temps nécessaire à l'expression de la résistance à l'antibiotiques, et enfin étalées sur milieu sélectif.

## **E. Extraction d'ADN plasmidique à partir de cultures bactériennes**

L'extraction d'ADN plasmidique des bactéries XL1-Blue est effectuée en utilisant le kit commercial « *Wizard*<sup>®</sup> *Plus SV Miniprep* » (Promega) qui se base sur le principe de la lyse alcaline. Le protocole suivi est celui préconisé par le fournisseur. Les plasmides sont remis en suspension dans 100  $\mu$ l d'eau stérile déminéralisée.

Pour des préparations d'ADN plus importantes (supérieures à 250  $\mu$ g), le kit « *Qiagen Plasmid Midi Kit* » (Qiagen) est utilisé.

## **F. Mutagenèse dirigée**

Les expériences de mutagenèse dirigée sont réalisées en utilisant le Kit « *QuickChange Site-Directed Mutagenesis* » (Stratagene). Deux oligonucléotides complémentaires sont établis de manière à encadrer la mutation à insérer. Chaque oligonucléotide contient la mutation et au moins 10 à 15 nucléotides sont conservés de part et d'autre de la mutation. Les oligonucléotides utilisés ainsi que la position des mutations sont détaillés dans le tableau m-8.

## **G. Séquençage de l'ADN**

### **1. Réaction de séquençage**

Le séquençage de l'ADN plasmidique ou de fragments de PCR est réalisé afin d'en vérifier la séquence.

La réaction de séquençage est réalisée au laboratoire à l'aide du kit « *DNA Sequencing Kit, version 1.1* » (ABI Prism, Applied Biosystem) dont le principe est basé sur la technique de Sanger. Une PCR utilisant l'ADN à séquencer comme matrice et des dNTP marqués à des fluorophores est réalisée, puis les ADN sont précipités et envoyés au Pôle Génotypage et Séquençage de la Plateforme Génomique Fonctionnelle de l'Université de Bordeaux 2 pour être analysés.

### **2. Précipitation de l'ADN**

La précipitation des ADN, dans le but de les concentrer, est réalisée avec de l'isopropanol. Pour cela, de l'acétate de sodium 3 M pH 5,2 (10% du volume de la solution d'ADN) est ajouté à l'ADN, supplémenté d'isopropanol (70% du volume d'ADN). Le mélange est ensuite incubé 15 minutes à température ambiante, puis centrifugé à 14 000g pendant 30 minutes à 4°C. Le précipité est lavé avec de l'éthanol 70% puis la solution est centrifugée comme précédemment. Le culot d'ADN est séché à l'air libre.



## H. Méthodes d'expression des ARN interférence (siRNA)

La séquence cible du siRNA Syt 9 est localisée dans le domaine C2B de Syt 9 (804-825 pb) et correspond à la séquence suivante : 5'- AATGGATGTAGGAGGACTCTC-3'. La séquence contrôle appelé siRNAcont est obtenue par Qiagen et correspond à la séquence aléatoire suivante: 5'-AATTCTCCGAACGTGTCACGT-3'. Cette séquence n'est pas spécifique d'une région du génome de la souris ou du hamster.

Les siRNA sont transcrits *in vitro* en utilisant le kit Silencer™ SiRNA Construction Kit (Ambion) et en suivant les recommandations du fournisseur.

L'expression des siRNA peut aussi être obtenue dans les cellules eucaryotes sous contrôle d'un promoteur H1 qui permet de recruter l'ARN polymérase. Pour cela, le plasmide pSUPER (OligoEngine), représenté en figure m-1, a été utilisé. Des oligonucléotides (tableau m-9) ont été générés selon les recommandations de Brummelkamp et coll. (Brummelkamp et al., 2002). Les oligonucléotides sont resuspendus dans de l'eau stérile à la concentration finale de 100 µM. L'hybridation des oligonucléotides est réalisée à partir de 0,1 unité de DO<sub>260</sub> de chaque oligonucléotide dans un volume final de 50 µl en tampon STE. Le mélange est chauffé à 90°C pendant 4 minutes, puis refroidi par paliers progressifs (70°C pendant 10 minutes / 4 minutes à 65°C / 4 minutes à 55°C / 4 minutes à 40°C / 20 minutes à 37°C / puis à 4°C jusqu'à utilisation). Les oligonucléotides hybridés sont phosphorylés sur leurs extrémités 5' par un traitement à la T4 kinase (NEB) selon les recommandations du fournisseur, et sont insérés dans le pSUPER préalablement digéré par les endonucléases *HindIII/BglIII* et déphosphorylé par un traitement à la SAP (*Shrimp Alcalin Phosphatase*, Roche). La ligation est réalisée selon le protocole standard (Chapitre III-A.2) avec un ratio plasmide/oligonucléotide de 1/5.

La vérification des clones bactériens obtenus se fait par double digestion *EcoRI/HindIII* et comparaison de la taille du fragment obtenu (environ 200 pb) par migration sur gel d'agarose 2%.

## IV. BIOCHIMIE

### A. Préparation des extraits cellulaires et tissulaires

#### 1. Préparation d'homogénats de lignée cellulaire de mammifères

Les homogénats de cellules MIN6 et INS-1E sont obtenus à partir de cellules à 80 % de confluence cultivées en flasque de 75 cm<sup>2</sup>. Les cellules sont lavées en PBS sans calcium/magnésium, décollées par une incubation de 10 minutes en PBS-EDTA 10 mM, récoltées et centrifugées à 1 000 g pendant 5 minutes à 4°C. Les extraits sont conservés sur glace à 4°C pour éviter les dégradations protéiques. Les cellules sont resuspendues dans du Tampon de Lyse Cellulaire, soniquées 1 minute (par pulse de 10 secondes interrompus de 10 secondes de pause, puissance 10-20%, *Sonicator*®, Misonix). La lyse est complétée par 20 passages au travers d'une seringue munie d'une aiguille de 27 gauge. L'homogénat est clarifié par centrifugation à 1 000 g pendant 10 minutes à 4°C, aliquoté et conservé à -80°C. La quantité de protéine contenues dans le surnageant est déterminée par dosage de Bradford comme décrit dans la Partie IV-E.1.

#### 2. Préparation de surnageants post-nucléaire

Lorsque les cellules de mammifère cultivées en plaque 24 puits (MIN6, HIT-T15 ou INS-1E) arrivent à ~90% de confluence, elles sont lavées avec du PBS pH 7,4, incubées à 37°C en présence de PBS supplémenté d'EDTA 10 mM pendant 10 minutes. Elles sont ensuite récoltées et centrifugées (3 000 g, 5 minutes, 4°C), puis resuspendues dans un tampon de lyse contenant du PBS supplémenté de 1% de Triton X100 puis soniquées (30 secondes, puissance 20%). Les cellules non cassées, les noyaux et les débris cellulaires volumineux sont éliminés par une centrifugation à 500 g, 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu après centrifugation, appelé surnageant post-nucléaire, est conservé à -20°C jusqu'à utilisation. Si cette suspension est destinée à être utilisée comme un échantillon pour migration sur gel de polyacrylamide, du Tampon de Charge pour électrophorèse est ajouté.

### 3. Préparation des synaptosomes

La préparation des synaptosomes est réalisée à partir du cortex cérébral de deux souris CD-1. Les tissus sont mis en suspension dans 50 ml de saccharose 320 mM à 40°C, puis homogénéisés par 10 allers-retours dans le Potter à 800 rpm à 4°C. La suspension est centrifugée 2 minutes à 3 000 g, à 4°C et le surnageant est récupéré et centrifugé à 14 000 g pendant 12 minutes à 4°C. Le culot se décompose en trois couches : la première couche au fond du tube, est de couleur noire et correspondant aux mitochondries, la seconde couche au centre est constituée des synaptosomes, et la troisième couche au-dessus, est blanche et contient essentiellement la myéline. La seconde couche est reprise dans le Tampon des Synaptosomes en évitant de reprendre les mitochondries. La suspension est aliquotée et la quantité de protéines totales est dosée selon le protocole de Bradford décrit dans la Partie IV-E.1. Les aliquots sont centrifugés à 14 000 g à 4°C pendant 12 minutes et les culots secs sont conservés à -20°C.

#### **B. Analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes**

Le gel d'électrophorèse est un réseau de mailles de taille variable selon le pourcentage d'acrylamide/bisacrylamide (37:1) utilisé, ce qui permet de séparer les protéines dans des conditions dénaturantes en fonction de leur masse moléculaire dans un champ électrique.

##### **1. Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide**

La technique du SDS-PAGE (*sodiumdodécylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) a été décrite par Laemmli en 1970 (Laemmli, 1970). Le gel est constitué de deux parties : un gel de concentration (4 % d'acrylamide/bisacrylamide (37:1)) et un gel de séparation (gel de 8 % à 15 %).

Les échantillons sont préparés en ajoutant du Tampon de Charge et en les chauffant à 95°C pendant 5 minutes afin de dénaturer les protéines. La migration se fait sous ampérage constant (10 mA pour le gel de concentration, 30 mA pour le gel de résolution) dans du tampon de migration.

## 2. Visualisation des protéines sur gels

Les protéines contenues dans les gels de polyacrylamide après migration peuvent être colorées avec le bleu de Coomassie qui se lie spécifiquement aux protéines. La coloration au bleu de Coomassie (Bio-Rad) se fait selon les recommandations du fournisseur.

### C. Electrotransfert et immunodétection : Western-blot

#### 1. Transfert semi-sec sur membrane de PVDF

Après migration, les protéines peuvent être électrotransférées sur une membrane de PVDF (polyvinylidène difluoride) (porosité de 0,45  $\mu\text{m}$ , GE Healthcare-Amersham Biosciences) afin de permettre une immunodétection de la protéine d'intérêt. La membrane est incubée 30 secondes dans du méthanol pur, puis réhydratée par un passage dans de l'eau distillée. Elle est ensuite équilibrée dans du tampon de transfert comme le gel. Après équilibration, les protéines du gel sont électrotransférées dans un système semi-sec (*Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell*, Bio-Rad) pendant deux heures à 4°C et à voltage constant (15 V). Le gel est posé sur la membrane entre deux épaisseurs de papier wathman imbibé de tampon de transfert. Ce « sandwich » est placé entre deux électrodes permettant le passage d'un courant électrique qui induit le transfert des protéines du gel vers la membrane.

Après le transfert, les membranes sont lavées trois fois à l'eau distillée, puis colorées au bleu de Coomassie (solution de coloration) afin de vérifier la qualité et l'homogénéité du transfert, et enfin complètement décolorées au méthanol pur.

#### 2. Immunodétection (ou immunoblot)

Après décoloration au méthanol, la membrane est réhydratée dans de l'eau distillée puis incubée dans du TBS-Tween 0,1%-Lait 5 % pendant une heure à température ambiante, afin de saturer des sites aspécifiques. Elle est ensuite incubée sur la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire, dirigé contre la protéine d'intérêt, dilué dans du TBS-Tween 0,1%-Lait 5%. Après trois lavages successifs au TBS-Tween 0,1% de 15 minutes, la membrane est incubée pendant une heure à température ambiante, avec l'anticorps secondaire dilué dans du TBS-Tween 0,1%-Lait 5 %. Cet anticorps est dirigé contre la partie constante de l'anticorps

primaire et est couplé à la peroxydase. Après trois lavages de quinze minutes en TBS-Tween 0,1%, la révélation du signal se fait à l'aide du kit ECL Lumi-Light<sup>plus</sup> Western Blotting Substrate (Roche Diagnostics, Meylan, France) selon les recommandations du fournisseur. L'acquisition des images est réalisée grâce à une caméra CCD (Ropers Scientific) pilotée par le système FluorChem v2.00. Les signaux peuvent être quantifiés grâce à ce système et la linéarité de chaque signal peut être vérifiée au cours des différentes expositions.

## **D. Dosage des protéines**

### **1. Dosage des protéines en solution**

Les protéines sont dosées grâce au réactif *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad) sur le principe du dosage de Bradford (Bradford, 1976).

### **2. Dosage des protéines sur gel**

La quantité des protéines peut être estimée sur gel après coloration au bleu de Coomassie. Les protéines colorées peuvent être quantifiées par comparaison de l'intensité des bandes avec celles d'une gamme de protéine BSA (Albumine Sérique de Bœuf) de concentration connue grâce au système Fluorchem v2.00 (alpha Innotech Corp.).

## **E. Test *in vitro* de translocation biochimique aux membranes**

Les cellules HIT-T15 sont transfectées avec des constructions de Syt cytosoliques couplées à la protéine GFP. 72 heures après transfection, les cellules sont lavées au PBS puis décollées avec 500 µl de PBS EDTA 10 mM. Elles sont ensuite centrifugées à 3 000g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot de cellules correspondant à la quantité de cellules de deux puits d'une plaque 24 puits, est resuspendue dans 100 µl de Tampon Calcium 2mM ou de Tampon EGTA 2 mM. Les cellules sont incubées à 37°C pendant 5 minutes puis immédiatement placées à 4°C dans la glace. Toutes les étapes suivantes seront effectuées à 4°C. Les suspensions cellulaires sont soniquées pendant 1 minute par pulses de 10 secondes interrompus de 10 secondes de pause à la puissance de 20%. Les lysats cellulaires sont aussitôt centrifugés à 500g pendant 10 minutes à 4°C. Les surnageants sont transférés dans des tubes à ultracentrifugation de 500 µl et centrifugés à 100 000g pendant 1 heure à 4°C. Les

surageants (100  $\mu$ l) sont récupérés et les culots resuspendus dans le même volume, puis les deux types d'échantillons sont déposés sur gel de polyacrylamide pour une analyse en immunoblot.

## V. BIOLOGIE CELLULAIRE

### A. Transfection des cellules de mammifères

Différents agents de transfection commerciaux ont été utilisés selon les lignées cellulaires : La Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 (Invitrogen) pour les cellules MIN6 et INS-1E, et le JetPEI (PolyPlus-Transfection) pour les cellules HIT-T15. Pour chacun des agents de transfection, des conditions optimales de transfection ont été établies en fonction des conditions de culture et selon les recommandations du fournisseur. Elles sont décrites ci-dessous. Les cellules sont transfectées lorsque les cellules atteignent 50-60% de confluence et le milieu de culture est changé avant la transfection.

#### 1. Plaque de 24 puits

Les conditions de transfection sont données pour un puits de cellules :

- JetPEI : le volume de milieu de culture dans lequel est effectué la transfection des cellules est de 1 ml. L'ADN (300 ng) est mélangé à 50 µl de chlorure de sodium (NaCl 150 mM) stérilisé par filtration sur membrane de nylon 0,22 µm. Le JetPEI (0,5 µl) est mélangé à 50 µl de NaCl. Chaque solution est mélangée à l'aide d'un vortex, centrifugée rapidement et la solution contenant le JetPEI est ajoutée à la solution d'ADN. L'ensemble est vortexé et centrifugé. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, les 100 µl de mélange ADN/JetPEI sont déposés dans un puits de cellules.
- Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 : les cellules sont placées dans 1 ml de milieu de culture. Un µl de Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 est dilué dans 50 µl d'Optimem1 (Invitrogen) et incubé 5 minutes à température ambiante. De même, l'ADN (400 ng) est dilué dans 50 µl d'Optimem1. Les deux solutions sont mélangées et le mélange est incubé 20 minutes avant d'être déposé sur les cellules.

#### 2. Boîte de Pétri 35 mm

Avant de transfecter les cellules, le milieu de culture est changé avec 2 ml de milieu. Les protocoles sont les mêmes que ceux utilisés en plaque de 24 puits, seules les quantités

d'ADN et d'agent de transfection varient. Les cellules MIN6 sont transfectées avec 800 ng d'ADN et 1,5 µl de Lipofectamine<sup>TM</sup>2000.

Pour certaines expériences, les cellules sont transfectées avec plusieurs plasmides. Dans ce cas, la quantité d'ADN utilisée pour transfecter un puits reste constante et est répartie entre les différents plasmides selon un pourcentage variable en fonction du type d'expérience réalisée.

## **B. Immunofluorescence**

Les cellules sontensemencées en plaque de 24 puits sur une lamelle de verre, transfectées ou non, puis traitées comme décrit ci-dessous lorsqu'elles atteignent 80% de confluence :

- Deux lavages de 5 minutes dans du PBS pH 7,4.
- Fixation des cellules avec une solution de PBS-Paraformaldéhyde 4 % (PBS-PFA) à température ambiante pendant 20 minutes.
- Deux lavages de 5 minutes en PBS, suivi d'un lavage en PBS supplémenté en BSA 2% (PBS-BSA).
- Saturation des sites aspécifiques et perméabilisation des cellules en PBS-BSA 2% supplémenté en saponine 0,1 % (PBS-BSA-SAP) pendant 30 minutes à température ambiante.
- Incubation avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS-BSA-SAP pendant une nuit à 4°C.
- Trois lavages de 5 minutes en PBS-BSA.
- Incubation pendant 1 heure à température ambiante et à l'obscurité, avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorophore dilué dans du PBS-BSA.
- Quatre lavages dans du PBS.
- Montage des lamelles sur lame : les lamelles sont rincées à l'eau distillée. Les cellules sont mises en contact avec le milieu de montage (Vectashield, Vector) afin d'éviter le photo-blanchiment au moment de l'observation. Les lamelles sont scellées sur la lame de verre par du vernis à ongles. Les lames sont ensuite conservées à 4°C à l'obscurité.



Les images des cellules sont acquises à l'aide d'un microscope Laser confocal Zeiss couplé à un système d'analyse d'image LSM 510 Meta. Les longueurs d'ondes d'excitation ( $\lambda$ ) utilisées sont de 488 nm (laser Argon2, vert) et 543/533 nm (lasers HleNe 1 et 2, rouge) et les filtres utilisés laissent passer les  $\lambda$  d'émission de 488 nm (vert) et 543 nm (rouge).

## VI. ANALYSES FONCTIONNELLES DES LIGNEES CELLULAIRES

### A. Sécrétion stimulée d'hormone de croissance

La sécrétion stimulée d'hormone de croissance est une approche permettant d'étudier l'effet de l'expression d'une protéine ou l'inhibition de son expression, sur la sécrétion des vésicules contenant l'hormone de croissance humaine (hGH) (Wick et al., 1993). Ainsi, nous allons doser les quantités d'hGH dans les surnageants cellulaires suite à différentes stimulations : KRB en condition basale et KCl ou glucose en conditions stimulées.

Les expériences de sécrétion sont effectuées avec les cellules HIT-T15, et INS-1E. Les cellules HIT-T15 possèdent plusieurs altérations dans la voie de glycolyse et leur sécrétion d'insuline ne peut pas être stimulée par le glucose mais elles répondent à la stimulation au chlorure de potassium (KCl). Les INS-1E répondent de manière stable à des concentrations physiologiques de glucose et de KCl (Merglen et al., 2004).

#### 1. Transfection transitoire

Le plasmide contenant l'ADNc codant pour l'hGH est co-transfecté avec le plasmide X contenant l'ADNc codant pour la protéine à exprimer ou avec les plasmides pSuper qui inhibent l'expression de protéines cibles en synthétisant des ARN interférents. Pour les transfections, le ratio entre le plasmide X et le pCDNA<sub>3</sub>-hGH sont compris entre 3/2 ou 7/3 selon les expériences réalisées. Les conditions de transfection sont celles décrites dans la Partie V, chapitre A.1.

#### 2. Incubation statique

Les expériences de sécrétion d'hGH sont réalisées trois jours après les transfections. Selon le type cellulaire, la stimulation (KCl ou glucose) et les conditions de stimulation (tampon, temps de stimulation...) sont différentes.

- Stimulation des INS-1E:

Les sécrétions sont faites dans un bain-marie à 37°C, avec des tampons préalablement chauffés, selon les étapes suivantes :

- Deux lavages au *Kreb's Ringer Buffer* spécifique des cellules INS-1E (KRB-INS) (750 µl).
- Incubation pendant 30 minutes en présence de KRB-INS (750 µl).
- Un lavage au KRB-INS (750 µl).
- Incubation de 30 minutes en KRB-INS supplémenté de glucose (2,8 mM ou 15 mM) ou de KCl (50 mM) (500 µl).
- Arrêt de la stimulation par prélèvement de 450 µl de surnageant dans les puits.
- Centrifugation des surnageants à 800 g pendant 5 minutes à 4°C, pour éliminer d'éventuelles cellules en suspension.
- Prélèvement de 400 µl de surnageant et congélation à -20°C jusqu'au dosage de l'hGH.

- Stimulation des HIT-T15 :

Ces cellules ne sécrètent pas en réponse au glucose mais sécrètent le contenu vésiculaire (insuline ou hGH) en réponse au KCl. La sécrétion est observable plus rapidement que celle en réponse au glucose puisqu'elle ne nécessite pas le métabolisme du glucose. Les sécrétions sont également faites dans un bain-marie à 37°C, selon les étapes suivantes :

- Deux lavages de 12 minutes au *Kreb's Ringer Buffer* spécifique des cellules HIT-T15 (KRB) (500 µl).
- Incubation de 12 minutes en KRB (condition basale) ou en KRB supplémenté de 50 mM KCl (condition stimulée) (400 µl).
- Arrêt de la stimulation par prélèvement de 350 µl de surnageant dans les puits.
- Centrifugation des surnageants à 800 g pendant 5 minutes à 4°C.
- Prélèvement de 325 µl de surnageant et addition de 25 µl de BSA 0,5 %.
- Congélation à -20°C jusqu'au dosage de l'hGH.

La quantification du contenu total d'hormone de croissance humaine dans les cellules est réalisée sur les cellules stimulées en condition basale (sans KCl ou 2,8 mM de Glucose). Ces cellules sont récoltées après incubation pendant 15 minutes en PBS supplémenté d'EDTA 10 mM à 37°C. Une solution de Triton X-100 à 10 % est diluée au dixième dans la suspension cellulaire et le mélange est incubé à 4°C pendant une heure, puis soniqué à 4°C (30 secondes,

puissance 20%). Les échantillons sont ensuite congelés à -20°C jusqu'au dosage de la quantité d'hGH.

### 3. Traitement à la streptolysine-O

La Streptolysine-O (SL-O) est une protéine cytotoxique, produite par *Streptococcus pyogenes*. Cette toxine est capable de former dans la membrane plasmique des pores, dont la taille (30 nm de diamètre) est suffisante pour permettre la diffusion des composés cytosoliques (Lang et al., 1997b). Nous pouvons donc déterminer la composition du cytosol en contrôlant la composition du tampon utilisé, et plus particulièrement la concentration en calcium libre et en ATP. La perméabilisation des cellules est réalisée à 37°C pendant 7 minutes. Pour chaque expérience, la quantité optimale de SL-O est déterminée sur des puits de cellules (puits contrôles). Une gamme de concentration de SL-O est déposée sur les cellules qui, après 7 minutes d'incubation à 37°C, sont incubées en présence de Bleu Trypan dans les puits. Seules les cellules perméabilisées se colorent en bleu, ce qui permet de déterminer la quantité optimale de toxine qui perméabilise le plus de cellules sans les décoller.

Pour ces expériences, les cellules sontensemencées dans des puits préalablement traités à la Polylysine.

Le protocole de sécrétion après perméabilisation à la SL-O, dont toutes les étapes se déroulent à 37°C, est le suivant:

- Un lavage au KRB de 7 minutes (500 µl).
- Perméabilisation des cellules en Tampon Bas Calcium (0,1 µM) supplémenté ou non en ATP (2 mM) et SL-O pendant 7 minutes (300 µl).
- Stimulation de la sécrétion pendant 7 minutes avec le Tampon Bas Calcium (0,1 µM) supplémenté ou non en ATP (2 mM) ou avec le Tampon Haut Calcium (10 µM) supplémenté ou non en ATP (2 mM) (500 µl).
- Arrêt de la stimulation par prélèvement de 450 µl de surnageant dans les puits.
- Centrifugation des surnageants à 800 g pendant 5 minutes à 4°C.
- Prélèvement de 400 µl de surnageant et dilution de l'échantillon avec 25 µl de BSA 0,5 %.
- Congélation à -20°C jusqu'au dosage de l'hGH contenue dans les surnageants.

## B. Dosage ELISA

Le dosage de l'hormone de croissance humaine est réalisée en ELISA sandwich (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) par le kit de dosage de l'hormone de croissance humaine qui utilise un anticorps primaire anti-hGH (Roche Diagnostics).

## C. Vidéomicroscopie

Les expériences de vidéomicroscopie sont effectuées sur des cellules cultivées sur des lamelles de verre en boîtes de Pétri 35 mm, etensemencées entre 70 000 à 200 000 cellules par boîtes de Pétri. Les cellules sont transfectées avec des vecteurs codant des protéines fluorescentes et elles sont utilisées dès qu'elles atteignent 70% de confluence et qu'elles expriment la protéine fluorescente. Les stimulations sont effectuées sur des cellules isolées en utilisant une micropipette positionnée grâce à un piezoelectric driver (pCS-1000, Burleigh Instruments) et reliée à un microinjecteur (Femtojet, Eppendorf). La stimulation de la translocation est effectuée à l'aide d'une injection des solutions de stimulation de 5 secondes à une pression de 3 Psi et à une distance d'environ 20  $\mu\text{m}$  de la cellule d'intérêt.

Les expériences de stimulation sont réalisées dans une chambre thermostatée à 37°C. Suivant l'agent de perméabilisation utilisé (ionophore ou détergent), le protocole varie :

- Stimulation à la ionomycine :

Après deux lavages avec 2 ml de KRB supplémenté en glucose 3 mM et calcium 1 mM pH 7,4, les cellules sont placées dans la chambre thermostatée dans ce même tampon. La stimulation des cellules est effectuée grâce à la même solution de KRB à laquelle est ajoutée la ionomycine (Sigma) à 10  $\mu\text{M}$  (Lajus et al., 2006).

- Stimulation à la digitonine :

Après deux lavages avec 2 ml de KRB supplémenté en glucose 3 mM et calcium 1 mM pH 7,4, les cellules sont placées dans la chambre thermostatée dans une solution contenant 0,4 mM d'EGTA (Tampon A). La solution de stimulation contient du calcium libre compris entre 2 et 1000  $\mu\text{M}$  et de la digitonine (Sigma) à 30  $\mu\text{M}$ . Les solutions de stimulation sont composées de  $\frac{1}{4}$  de volume de digitonine à 120  $\mu\text{M}$ ,  $\frac{1}{2}$  de volume de Tampon Intracellulaire (TIC 2X) et  $\frac{1}{4}$  de volume de solution calcique tamponnée en utilisant des chélateurs des ions métalliques, le NTA (acide nitrilotriacétique) et le HEDTA (acide

hydroxyéthylènediamine tétraacétique) comme décrit dans la publication (Grise et al., en révision).

Les images ont été prises à l'aide d'un microscope inversé (Nikon TD300, Champigny-sur-Marne, France) équipé d'un monochromateur (Till Photonics, Gräfelfing, Allemagne) et d'une série de filtres permettant l'identification des cellules transfectées (Sutter,  $\lambda$ 10-2, Novato, CA, USA). Le microscope est relié à une caméra CCD (Micromax 1300Y HS, Roper Scientific, East Syracuse, NY, USA) qui permet de réaliser des films à partir d'une série d'acquisition d'images prises toutes les 0,5 s à 1 s sur une période allant de 30 secondes à 2 minutes grâce au logiciel Metamorph (Universal Imaging, Downingtown, PA, USA).

## Composition des tampons et solutions

### Solutions pour l'analyse des acides nucléiques :

**Tampon de Charge pour ADN :** Glycérol 20% (m/v), bleu de bromophénol 1 mg/ml dans de l'eau déminéralisée

**TBE :** Tris 89 mM, Borate 89 mM, EDTA 2 mM ; pH 8

**TE 10:1 pH8:** Tris 10 mM, EDTA 1 mM ; pH 8

**Tampon STE 4X :** Tris 40 mM pH 7,5 ; NaCl 200 mM

### Composition des gels d'acrylamide, solutions pour SDS-PAGE et Western-blot :

Composants	Gel de concentration	Gel de résolution
Tris	125 mM, pH 6,8	375 mM, pH 8,8
SDS	0,1 % (m/v)	0,1 % (m/v)
Acrylamide/bisacrylamide (37 :1)	4 % (m/v)	8 à 15 % (m/v)
APS	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)
TEMED	0,2 % (v/v)	0,1 % (v/v)

Composition des gels de polyacrylamides

**Tampon de migration :** Tris 25 mM ; glycine 192 mM ; SDS 3,5 mM

**Tampon de Charge :** Glycérol 10% (m/v), bleu de bromophénol 50 µg/ml, β-mercaptoéthanol 8% (v/v), SDS 2% (m/v)

**Tampon de Transfert :** Tris 47,8 mM ; glycine 38,6 mM ; SDS 0,036% (m/v) ; méthanol 20% (v/v)

**Solution de coloration des membranes PVDF :** acide acétique 10% (v/v) ; méthanol 25% (v/v) ; bleu de Coomassie 0,05% (m/v)

**Solution de décoloration des membranes PVDF :** acide acétique 7% (v/v) ; méthanol 50% (v/v)

**TBS-T :** Tris 50 mM pH 8 ; NaCl 190 mM ; Tween 0,1% (v/v)

**TBS-T-lait :** TBS-T supplémenté de 5 % (m/v) de lait écrémé

**Solution pour les bactéries :**

**Milieu bactérien LB :** Tryptone 10g/L, Extrait de levure 5g/L, Chlorure de sodium 5g/L.  
Pour les milieux solides, ajout de Bacto-agar à 20g/L.

**Solutions pour l'étude protéique à partir des tissus :**

**Tampon d'Homogénéisation de cerveau :** HEPES 10 mM pH 7,2 ; saccharose 250 mM ;  
KCl 130 mM ; PMSF 0,5 mM

**Tampon intracellulaire (TIC 1X) :** KCl 140 mM ; NaCl 5 mM ; MgSO<sub>4</sub> 7 mM ; HEPES 20  
mM ; EGTA 10 mM ; Leupeptine 12,5 µg/ml ; Aprotinine 2,5 µg/ml ; pH 7

**Tampon des Synaptosomes :** HEPES 10 mM ; Saccharose 320 mM ; NaOH pH 7,4

**Solutions pour les études à partir des cellules:**

**Tampon de Lyse Cellulaire :** MOPS 20 mM pH 7 ; saccharose 250 mM ; MgCl<sub>2</sub> 5mM ;  
EDTA 1 mM ; Triton X-100 1 % (v/v) ; Leupeptine 1 µg/l ; Aprotinine 1 µg/l ; Pepstatine 1  
µg/l

**Tampon Calcium 2mM :** TIC 1X ; Leupeptine 1 µg/l ; Aprotinine 1 µg/l ; Benzamidie 1 µg/l ;  
ionomycine 10 µM ; CaCl<sub>2</sub> 2 mM

**Tampon EGTA 2 mM :** TIC 1X ; Leupeptine 1 µg/l ; Aprotinine 1 µg/l ; Benzamidie 1 µg/l ;  
EGTA 2 mM

**Tampon Ca<sup>5</sup> (10<sup>-5</sup> M Ca<sup>2+</sup>) :** 40 mM EGTA ; 40 mM CaCl<sub>2</sub> ; pH<sub>KOH</sub> 7,0

**Tampon Ca<sup>12</sup> (10<sup>-7</sup> M Ca<sup>2+</sup>) :** 83,5% (v/v) de 40 mM EGTA ; 16,5% (v/v) de Tampon Ca<sup>5</sup> ;  
pH<sub>KOH</sub> 7,0

**Tampon Bas Ca<sup>2+</sup> (0,1 µM Ca<sup>2+</sup>) :** 2 vol de TIC 2X, 1 vol de Tampon Ca<sup>12</sup>, 1 vol d'eau,  
pH<sub>KOH</sub> 7,0

**Tampon Haut Ca<sup>2+</sup> (10 µM Ca<sup>2+</sup>) :** 2 vol de TIC 2X, 1 vol de Tampon Ca<sup>5</sup>, 1 vol d'eau,  
pH<sub>KOH</sub> 7,0

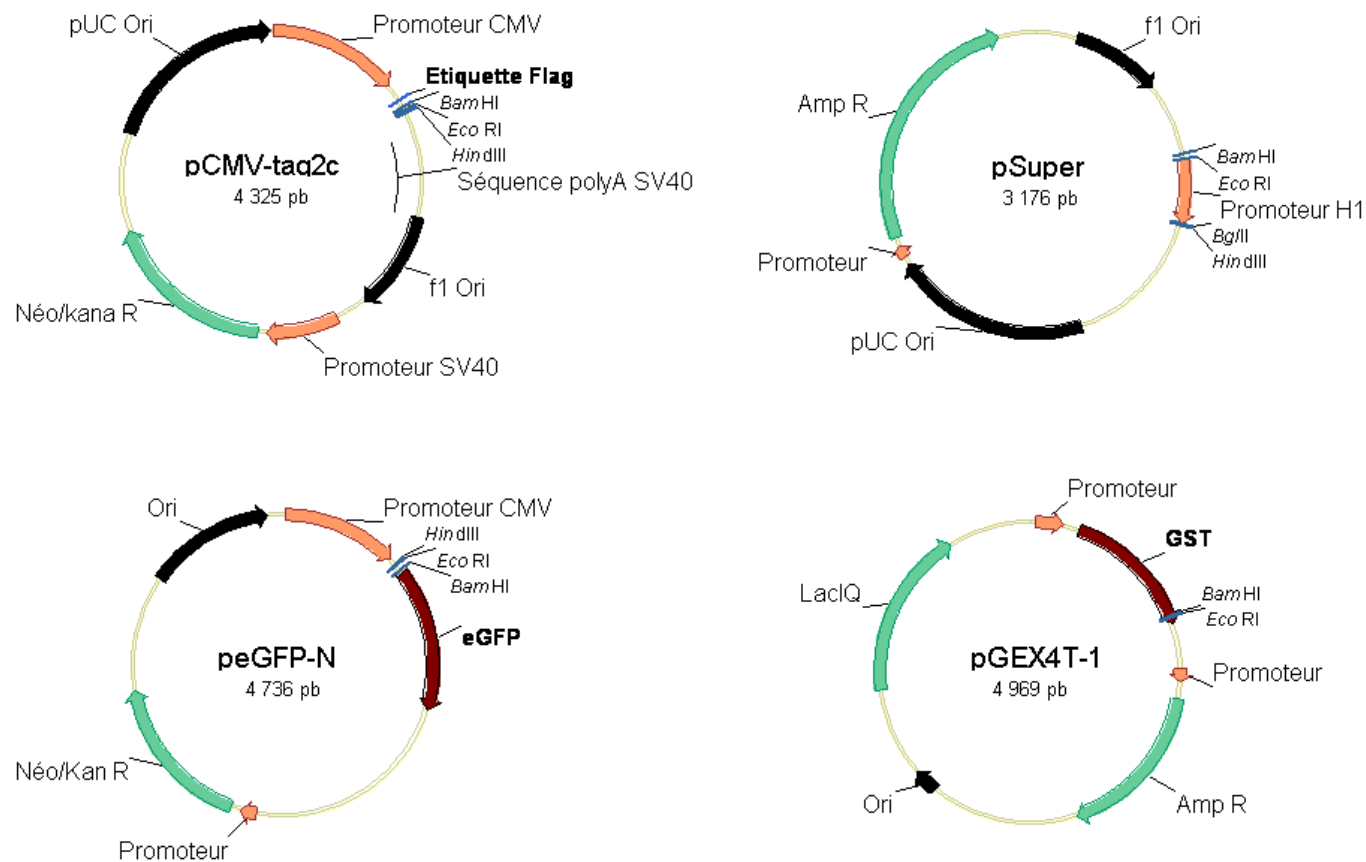
**Tampon A :** 10 vol TIC 2X ; 0,1 vol EGTA 40 mM



**PBS** : NaCl 137 mM ; KCl 2,7 mM ; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,3 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM ; pH 8 ou 7,4

**KRB** : NaCl 125 mM ; KCl 5 mM ; MgSO<sub>4</sub> 2 mM ; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM ; HEPES 25 mM ; glucose 3 mM ; CaCl<sub>2</sub> 1 mM ; BSA 0,05% ; pH 7,4

**KRB-INS** : NaCl 135 mM ; KCl 3,6 mM ; NaHCO<sub>3</sub> 5 mM ; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 mM ; MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM ; HEPES 10 mM ; CaCl<sub>2</sub> 1,5 mM ; BSA 0,1% ; pH 7,4



**Figure m-1 : Cartes de restriction des vecteurs utilisés pour réaliser les constructions plasmidiques**

Les sites de restriction utilisés lors de la construction des différents plasmides sont indiqués.

Nom	Protéine exprimée (acides aminés)	Source	Vecteur
Syt 9 Ct	44-386	PCR	peGFPN <sub>1</sub> N <sub>2</sub>
Syt 9 Ct RNAi <sup>R</sup>	44-386	mutagenèse	peGFPN <sub>1</sub> N <sub>2</sub>
Syt 9 C2AB	77-386	PCR	peGFPN <sub>3</sub>
Syt 9 C2A	77-233	PCR	peGFPN <sub>3</sub>
Syt 9 C2B	215-386	PCR	peGFPN <sub>3</sub>
Syt 9 C2AB D145N	77-386	mutagenèse	peGFPN <sub>3</sub>
Syt 9 C2AB D197,199N	77-386	mutagenèse	peGFPN <sub>3</sub>
Syt 9 C2AB D330,332N	77-386	mutagenèse	peGFPN <sub>3</sub>
Syt 2 C2AB	101-422	PCR	peGFPN1
Syt 9	1-386	PCR	pCMVtag2c
Syt 9 D145N	1-386	mutagenèse	pCMVtag2c
Syt 9 D197,199N	1-386	mutagenèse	pCMVtag2c
Syt 9 D330,332N	1-386	mutagenèse	pCMVtag2c
Syt 9 RNAi <sup>R</sup>	1-386	mutagenèse	pCMVtag2c
Syt 9 D145N RNAi <sup>R</sup>	1-386	mutagenèse	pCMVtag2c
Syt 9 D197,199N RNAi <sup>R</sup>	1-386	mutagenèse	pCMVtag2c
Syt 9 D330,332N RNAi <sup>R</sup>	1-386	mutagenèse	pCMVtag2c
pSuper cont	-	hybridation des ARN interférence	pSuper
pSuperSyt9	-	hybridation des ARN interférence	pSuper
pSuperSyt9 mutated	-	hybridation des ARN interférence	pSuper
GST-Syt 9 C2AB	77-386	PCR	pGEX4T-1 procaryote
pCDNA <sub>3</sub> -mStrawberry	-	Sous-clonage <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI de pRSET-BmStrawberry	pCDNA <sub>3</sub> Syt9
Syt9 C <sub>2</sub> AB-mStrawberry	77-386	PCR	pCDNA <sub>3</sub> - mStrawberry
LPH-GFP	Latrophiline	Décrit dans (Lajus et al., 2006)	peGFPN

**Tableau m-1 : Liste des plasmides réalisés et utilisés**

Toutes les constructions réalisées au laboratoire sont répertoriées dans ce tableau. Le nom, la longueur de la protéine exprimée sont détaillés dans les deux premières colonnes. La technique utilisée pour réaliser ces constructions, et le vecteur, dans lequel la séquence est insérée, sont aussi indiqués dans les troisième et quatrième colonnes.

<b>Nom</b>	<b>Protéine exprimée</b>	<b>Source</b>
BoNT /C	Chaîne légère de la toxine botulinique C	Dr. H. Niemann et Dr. T. Binz (MHN Hannover, FRG) (Vaidyanathan et al., 1999)
BoNT /E	Chaîne légère de la toxine botulinique E	Dr. H. Niemann et Dr. T. Binz (MHN Hannover, FRG) (Vaidyanathan et al., 1999)
Phogrine-GFP	Phogrine couplée à la GFP	Dr. W. Almers (Portland, US)
CD63-GFP	CD63 couplée à la GFP	Dr. G.Griffiths (Université de Cambridge, Royaume-Uni)
Rab7-GFP	Rab 7 couplée à la GFP	Dr. B.van Deurs (Institut Panum, Copenhague)
SVP38-GFP	Synaptophysine couplée à la GFP	Dr. C. Dotti (Turin, Italie)
VGF-GFP	VGF couplée à la GFP	Dr. R. Possenti (Rome, Italie)
pKS-Syt2	Synaptotagmine 2	Décrit dans (Lang et al., 1997a)
PKC $\alpha$ -eGFP	PKC $\alpha$ couplée à la GFP	Dr. C.Larsson (Université de Lund, Suède)
pRSET-BmStrawberry	Protéine fluorescente Strawberry	Dr. R.Tsien (Shaner et al., 2004)
pCDNA3-hGH	Hormone de croissance humaine	Décrit dans (Lajus et al., 2006)

**Tableau m-2 : Liste des plasmides utilisés**

Les différents vecteurs, non construits au sein du laboratoire, sont répertoriés dans ce tableau. Le nom et l'origine de chaque plasmide sont listés ainsi que la protéine codée par le plasmide.

<b>Anticorps</b>	<b>Clone</b>	<b>Espèce</b>	<b>Fournisseur</b>	<b>Dilution</b>
Anti-Syt 9	46	Souris	BD	1 /100
Anti-syntaxine 1a	HPC-1	Souris	Sigma	1/100
Anti-SNAP-25	SMI81	Souris	Sternberger M.Inc.	1/500
Anti-VAMP2	69.1	Souris	Synaptic System	1/100
Anti-synaptophysine	GS28	Souris	StressGen (Tebu)	1/10
Anti-Flag M2	-	Souris	Stratagene	1/1 000
Anti-complexine 1/2	-	Lapin	Synaptic System	1/100
Anti-LAMP1	-	Souris	Dr. ML. Malosio (Milan)	1/4
Anti- $\beta$ COP	maD	Souris	Sigma	1/100
Anti- G58K	58K-9	Souris	Sigma	1/100
Anti-AP2	-	Souris	Dr. A.Hémar (Bordeaux)	1/300
Anti-AP1/AP2	100/1	Souris	Sigma	1/100
Anti-Vti1a	45	Souris	Transduction Laboratories	1/50
Anti-Vti1b	7	Souris	Transduction Laboratories	1/50
Anti-TfR	H684	Souris	Dr. A. Hémar (Bordeaux)	1/200
Anti-insuline	K36AC10	Souris	Sigma	1/1 000
Anti-insuline	-	Cochon d'inde	Biodesign	1/500
Anti-calréticuline	16	Souris	Stressgen	1/100
Anti-chromogranine	-	Souris	Dr. ML. Malosio (Milan)	1/400
Anti-SVP38	SVP-38	Souris	Sigma	1/200
Anti-EEA 1	-	Souris	Dr. J. Grunberg (Genève)	1/100
LysoTracker	L7528	Sonde synthétique	Invitrogen	1/500
Anti-TiVAMP	58.2	Souris	Dr. T.Galli (Paris)	1/50
Anti-Munc18	-	Lapin	Synaptic System	1/100
Anti-SV2B	-	Lapin	Synaptic System	1/100
Anti-Synapsine	46.1	Souris	Synaptic System	1/500
Anti-C peptide humain	9NID4/D5	Rat	Dr. C Larsson (Suède)	1/200

**Tableau m-3 : Listes des anticorps primaires utilisés en immunofluorescence**

Pour chaque anticorps utilisé, le clone, le fournisseur et la dilution réalisée sont répertoriés.

<b>Anticorps</b>	<b>Clone</b>	<b>Espèce</b>	<b>Fournisseur</b>	<b>Dilution Ac I<sup>aire</sup></b>	<b>Dilution Ac II<sup>aire</sup> HRP</b>
Anti-Syt 9	46	Souris	BD	1/1 000	1/2 000
Anti-Syt 1 C-ter	41.1	Souris	Synaptic System	1/1 000	1/5 000
Anti-Syt 1 N-ter	604.4	Souris	Synaptic System	1/1 000	1/5 000
Anti-Syt 2	8G2b	Souris	(Lang et al., 1997a)	1/2 000	1/5 000
Anti-Syt 1/2	-	Lapin	(Lang et al., 1997a)	1/5 000	1/5 000
Anti-Syt 7	-	Lapin	Synaptic System	1/3 000	1/5 000
Anti-Syt 7	-	Lapin	Dr. N. Andrews (Martinez et al., 2000)	1/1 000	1/5 000
Anti-syntaxine 1a	HPC-1	Souris	Sigma	1/3 000	1/5 000
Anti-syntaxine 6	3D10	Souris	StressGen	1/1 000	1/5 000
Anti-SNAP-25	SMI81	Souris	Sternberger M.Inc.	1/2 000	1/5 000
Anti-SNAP-25	-	Lapin	(Lang et al., 1997b)	1/2 000	1/5 000
Anti-VAMP2	GS28	Souris	StressGen	1/2 000	1/5 000
Anti- $\alpha$ / $\beta$ SNAP	77.2	Souris	Synaptic System	1/1 000	1/2 000
Anti-complexine 1/2	-	Lapin	Synaptic System	1/1 000	1/3 000
Anti-ICA 512	-	Souris	Dr. M. Solimena (Dresde)	1/250	1/2 000
Anti- $\beta$ actine	AC-15	Souris	Abcam	1/10 000	1/5 000
Anti- $\beta$ tubuline	-	Souris	Sigma	1/5 000	1/5 000
Anti-Hsc 70	Brm22	Souris	Sigma	1/3 000	1/3 000
Anti-Flag M2	-	Souris	Stratagene	1/10 000	1/5 000
Anti-GST	GST-2	Souris	Sigma	1/10 000	1/5 000
Anti-eGFP	Sc8334	Lapin	Santa Cruz	1/2 000	1/5 000

**Tableau m-4 : Listes des anticorps primaires utilisés en Western-blot**

Pour chaque anticorps utilisé, le clone, le fournisseur et la dilution réalisée sont répertoriés. La dernière colonne mentionne la dilution de l'anticorps secondaire couplé à la HRP (*Horseradish peroxydase*) utilisé pour détecter l'anticorps primaire.

<b>Anticorps</b>	<b>Espèce</b>	<b>Fournisseur</b>	<b>Dilution</b>
Anti-Souris Cy3	Chèvre	Jackson ImmunoResearch	1/300
Anti-Lapin Cy3	Chèvre	Jackson ImmunoResearch	1/300
Anti-Cochon d'inde Cy3	Ane	Jackson ImmunoResearch	1/300
Anti-Souris FITC	Ane	Jackson ImmunoResearch	1/300
Anti-Rat FITC	Ane	Jackson ImmunoResearch	1/300

**Tableau m-5 : Anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence**

Ce tableau répertorie le nom de l'anticorps secondaire utilisé et sa dilution, l'espèce dans laquelle l'anticorps est synthétisé et son fournisseur. Pour chaque anticorps, le fluorophore qui lui est couplé est indiqué.

<b>Anticorps</b>	<b>Espèce</b>	<b>Fournisseur</b>
Anti-Souris HRP	Chèvre	GE Healthcar
Anti-Lapin HRP	Chèvre	GE Healthcar

**Tableau m-6 : Anticorps secondaires utilisés en Western blot**

Ce tableau répertorie le nom de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (HRP, *Horseradish peroxidase*), l'espèce dans laquelle l'anticorps est synthétisé et son fournisseur.

Nom	Séquence sens (5'-3')	Séquence antisens (5'-3')
Syt 9 C2AB	TTGGAATTCATGCTGGGCCGGAGTTACATAG EcoR <sub>I</sub>	TCTGGATCCTCCGGGTGCAGGTATTGGCC BamH <sub>I</sub>
Syt 9 C2A	TTGGAATTCATGCTGGGCCGGAGTTACATAG EcoR <sub>I</sub>	TCTGGATCCAGCCACCTGCAGCTCTCTC BamH <sub>I</sub>
Syt 9 C2B	TTGGAATTCATGAGTTCAGTGAACCTGG EcoR <sub>I</sub>	TCTGGATCCTCCGGGTGCAGGTATTGGCC BamH <sub>I</sub>
Syt 2 C2AB	TTGGAATTCATGAAGGGCAAAGGCATGAAG EcoR <sub>I</sub>	AGTGGATCCTTGTTCTTGCCCAGAAGAG BamH <sub>I</sub>
GST-Syt 9 C2AB	TTGGAATTCATGCTGGGCCGGAGTTACATAG EcoR <sub>I</sub>	AGAATTCTCAGGGTGCAGGTATTGGC EcoR <sub>I</sub>
Syt9 C2AB Strawberry	CCCAAGCTTATGCTGGGCCGGAGTTACATAG HindIII	TCTGGATCCGGTCCGGGTGCAGGTATTGGCC BamH <sub>I</sub>
Syt 11 C2AB eGFP	ATAGAATTCATGTCCGAGAGGAAGACGTG EcoR <sub>I</sub>	ATTGGATCCTCCGTA CTGCTCAGACTGTGC BamH <sub>I</sub>
Syt 5 ORF eGFP	CCGAGCGCTATGCCCCGGGGCCAGGG Eco47III	CCGGAATTCTCGTTTCTCCACCAGG EcoR <sub>I</sub>
Syt9 RT-PCR HIT	TATGTCCCCACGGCCGGGAAGC	AGCCCAGTGCCGCAGGCCAGC

**Tableau m-7: Séquences des couples d'oligonucléotides utilisés pour les PCR**

**Le couple d'oligonucléotides utilisé pour amplifier la séquence par PCR est répertorié dans ce tableau, ainsi que le couple d'amorce pour la RT-PCR. Les sites de restriction utilisés pour les sous-clonages sont soulignés.**



Nom de la construction	Séquence de l'oligonucléotide sens pour la mutagenèse (5'-3')
Syt 9 Ct RNAi <sup>R</sup>	ACCTGAAGAAAATGGAC <u>CGT</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> CCTCTCAGATCCCT
Syt 9 C2AB D145N	CCTAGGAGGTTCTCA <u>A</u> ATCCCTATGTTAGTGTCT
Syt 9 C2AB D197,199N	GGTCATGGCGGTGTAT <u>A</u> ACTTT <u>A</u> ATCGGTTCTCCCGCAACG
Syt 9 C2AB D330,332N	CTGACTGTTCTG <u>A</u> ATTAT <u>A</u> ACAAACTGGGGAAGAATGAG
Syt 9 D145N	CCTAGGAGGTTCTCA <u>A</u> ATCCCTATGTTAGTGTCT
Syt 9 D197,199N	GGTCATGGCGGTGTAT <u>A</u> ACTTT <u>A</u> ATCGGTTCTCCCGCAACG
Syt 9 D330,332N	CTGACTGTTCTG <u>A</u> ATTAT <u>A</u> ACAAACTGGGGAAGAATGAG
Syt 9 RNAi <sup>R</sup>	ACCTGAAGAAAATGGAC <u>CGT</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> CCTCTCAGATCCCT
Syt 9 D145N RNAi <sup>R</sup>	ACCTGAAGAAAATGGAC <u>CGT</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> CCTCTCAGATCCCT
Syt 9 D197,199N RNAi <sup>R</sup>	ACCTGAAGAAAATGGAC <u>CGT</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> CCTCTCAGATCCCT
Syt 9 D330,332N RNAi <sup>R</sup>	ACCTGAAGAAAATGGAC <u>CGT</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> CCTCTCAGATCCCT

**Tableau m-8: Séquence des oligonucléotides pour la mutagenèse dirigée**

Seul l'oligonucléotide sens (5'-3') du couple d'oligonucléotides de mutagenèse est répertorié. Les nucléotides modifiés sont soulignés et écrits en gras.

Nom	Couple d'oligonucléotides
pSuper Syt9	<p style="text-align: center;"><i>Bg</i>III      Séquence cible sens                      <b>Boucle</b>                      Séquence cible antisens                      <i>Hind</i>III</p> <p style="text-align: center;">5'-GATCTA<u>AATGGATGTAGGAGGACTCTCTTCAAGAGAGAGAGATCCTCCTACATCCATTTTTTTTA</u>-3'</p> <p style="text-align: center;">3'-ATTACCTACATCCTCCTGAGAGA<b>AAGTTCTCTCTCTCAGGAGGATGTAGGTA</b>AAAAAATTCGA-5'</p>
pSuper Syt9 mutated	<p style="text-align: center;"><i>Bg</i>III      Séquence cible sens                      <b>Boucle</b>                      Séquence cible antisens                      <i>Hind</i>III</p> <p style="text-align: center;">5'-GATCTA<u>AATGGACGT</u><b>CGGCGGCCTCTCTTCAAGAGAGAGAGGCCGCCGACGTCCATTTTTTTTA</b>-3'</p> <p style="text-align: center;">3'-ATTACCT<b>GCAGCCGCCGGAGAGA</b>AAGTTCTCTCTCTCCGGCGGCTGCAGGTA AAAAAATTCGA-5'</p>
pSuper cont	<p style="text-align: center;"><i>Bg</i>III      Séquence cible sens                      <b>Boucle</b>                      Séquence cible antisens                      <i>Hind</i>III</p> <p style="text-align: center;">5'-GATCTA<u>AATTCTCCGAACGTGTCACGT</u><b>TTCAAGAGA</b>ACGTGACACGTTCGGAGAATTTTTTTTA-3'</p> <p style="text-align: center;">3'-ATTAAGAGGCTTGCACAGTGCAA<b>AAGTTCTCTT</b>GCACTGTGCAAGCCTCTTAAAAAATTCGA-5'</p>

**Tableau m-9 : Séquences des oligonucléotides utilisés pour les constructions pSuper**

Les couples d'oligonucléotides qui ont servi à construire les vecteurs pSuper sont répertoriés dans ce tableau. Les séquences cibles sens et antisens sont soulignées et les boucles sont écrites en gras. Les extrémités à bouts cohésifs correspondent aux sites de restriction qui sont inscrits et les nucléotides modifiés dans la construction pSuper Syt9 mutated sont écrits en gras et en italique.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



## A

- Abderrahmani, A., Niederhauser, G., Plaisance, V., Roehrich, M. E., Lenain, V., Coppola, T., Regazzi, R. and Waeber, G.** (2004). Complexin I regulates glucose-induced secretion in pancreatic beta-cells. *J Cell Sci* **117**, 2239-47.
- Aikawa, Y., Lynch, K. L., Boswell, K. L. and Martin, T. F.** (2006a). A second SNARE role for exocytic SNAP25 in endosome fusion. *Mol Biol Cell* **17**, 2113-24.
- Aikawa, Y., Xia, X. and Martin, T. F.** (2006b). SNAP25, but not syntaxin 1A, recycles via an ARF6-regulated pathway in neuroendocrine cells. *Mol Biol Cell* **17**, 711-22.
- Ales, E., Tabares, L., Poyato, J. M., Valero, V., Lindau, M. and Alvarez de Toledo, G.** (1999). High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism. *Nat Cell Biol* **1**, 40-4.
- Amarzguioui, M., Rossi, J. J. and Kim, D.** (2005). Approaches for chemically synthesized siRNA and vector-mediated RNAi. *FEBS Lett* **579**, 5974-81.
- An, S. J. and Almers, W.** (2004). Tracking SNARE complex formation in live endocrine cells. *Science* **306**, 1042-6.
- Andrew, N. W. and Chakrabartia, S.** (2005). There's more to life than neurotransmission: the regulation of exocytosis by synaptotagmin VII. *Trends Cell Biol* **15**, 626-631.
- Arac, D., Chen, X., Khant, H. A., Ubach, J., Ludtke, S. J., Kikkawa, M., Johnson, A. E., Chiu, W., Sudhof, T. C. and Rizo, J.** (2006). Close membrane-membrane proximity induced by Ca<sup>2+</sup>-dependent multivalent binding of synaptotagmin-1 to phospholipids. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 209-17.
- Arantes, R. M. and Andrews, N. W.** (2006). A role for synaptotagmin VII-regulated exocytosis of lysosomes in neurite outgrowth from primary sympathetic neurons. *J Neurosci* **26**, 4630-7.
- Archer, D. A., Graham, M. E. and Burgoyne, R. D.** (2002). Complexin regulates the closure of the fusion pore during regulated vesicle exocytosis. *J Biol Chem* **277**, 18249-52.
- Arkhammar, P., Nilsson, T., Rorsman, P. and Berggren, P. O.** (1987). Inhibition of ATP-regulated K<sup>+</sup> channels precedes depolarization-induced increase in cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> concentration in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* **262**, 5448-54.
- Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P. A. and Wollheim, C. B.** (1992). Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* **130**, 167-78.
- Ashcroft, F. M., Harrison, D. E. and Ashcroft, S. J.** (1984). Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* **312**, 446-8.

- Ashcroft, F. M., Proks, P., Smith, P. A., Ammala, C., Bokvist, K. and Rorsman, P.** (1994). Stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells. *J Cell Biochem* **55 Suppl**, 54-65.
- Atiya-Nasagi, Y., Cohen, H., Medalia, O., Fukudan, M. and Sagi-Eisenberg, R.** (2005). O-glycosylation is essential for intracellular targeting of synaptotagmins I and II in non-neuronal specialized secretory cells. *J Cell Sci* **118**, 1363-72.
- Atlas, D.** (2001). Functional and physical coupling of voltage-sensitive calcium channels with exocytotic proteins: ramifications for the secretion mechanism. *J Neurochem* **77**, 972-85.
- Atlas, D., Wisner, O. and Truss, M.** (2001). The voltage-gated  $Ca^{2+}$  channel is the  $Ca^{2+}$  sensor of fast neurotransmitter release. *Cell Mol Neurobiol* **21**, 717-31.
- Audhya, A., Foti, M. and Emr, S. D.** (2000). Distinct roles for the yeast phosphatidylinositol 4-kinases, Stt4p and Pik1p, in secretion, cell growth, and organelle membrane dynamics. *Mol Biol Cell* **11**, 2673-89.

## B

- Babity, J. M., Armstrong, J. N., Plumier, J. C., Currie, R. W. and Robertson, H. A.** (1997). A novel seizure-induced synaptotagmin gene identified by differential display. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2638-41.
- Bai, J., Earles, C. A., Lewis, J. L. and Chapman, E. R.** (2000). Membrane-embedded synaptotagmin penetrates cis or trans target membranes and clusters via a novel mechanism. *J Biol Chem* **275**, 25427-35.
- Bai, J., Tucker, W. C. and Chapman, E. R.** (2004a). PIP<sub>2</sub> increases the speed of response of synaptotagmin and steers its membrane-penetration activity toward the plasma membrane. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 36-44.
- Bai, J., Wang, C. T., Richards, D. A., Jackson, M. B. and Chapman, E. R.** (2004b). Fusion pore dynamics are regulated by synaptotagmin\**t*-SNARE interactions. *Neuron* **41**, 929-42.
- Bai, J., Wang, P. and Chapman, E. R.** (2002). C2A activates a cryptic  $Ca^{2+}$ -triggered membrane penetration activity within the C2B domain of synaptotagmin I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1665-70.
- Balczon, R., Overstreet, K. A., Zinkowski, R. P., Haynes, A. and Appel, M.** (1992). The identification, purification, and characterization of a pancreatic beta-cell form of the microtubule adenosine triphosphatase kinesin. *Endocrinology* **131**, 331-6.

- Baram, D., Linial, M., Mekori, Y. A. and Sagi-Eisenberg, R.** (1998).  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent exocytosis in mast cells is stimulated by the  $\text{Ca}^{2+}$  sensor, synaptotagmin I. *J Immunol* **161**, 5120-3.
- Barclay, J. W., Craig, T. J., Fisher, R. J., Ciuffo, L. F., Evans, G. J., Morgan, A. and Burgoyne, R. D.** (2003). Phosphorylation of Munc18 by protein kinase C regulates the kinetics of exocytosis. *J Biol Chem* **278**, 10538-45.
- Barclay, J. W., Morgan, A. and Burgoyne, R. D.** (2005). Calcium-dependent regulation of exocytosis. *Cell Calcium* **38**, 343-53.
- Barg, S., Eliasson, L., Renstrom, E. and Rorsman, P.** (2002). A subset of 50 secretory granules in close contact with L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels accounts for first-phase insulin secretion in mouse beta-cells. *Diabetes* **51 Suppl 1**, S74-82.
- Barg, S., Ma, X., Eliasson, L., Galvanovskis, J., Gopel, S. O., Obermuller, S., Platzer, J., Renstrom, E., Trus, M., Atlas, D. et al.** (2001). Fast exocytosis with few  $\text{Ca}^{2+}$  channels in insulin-secreting mouse pancreatic B cells. *Biophys J* **81**, 3308-23.
- Barg, S. and Rorsman, P.** (2004). Insulin secretion: a high-affinity  $\text{Ca}^{2+}$  sensor after all? *J Gen Physiol* **124**, 623-5.
- Bataille, D.** (2002). [Molecular mechanisms of insulin secretion]. *Diabetes Metab* **28**, 4S7-13.
- Bayer, M. J., Reese, C., Buhler, S., Peters, C. and Mayer, A.** (2003). Vacuole membrane fusion: V0 functions after trans-SNARE pairing and is coupled to the  $\text{Ca}^{2+}$ -releasing channel. *J Cell Biol* **162**, 211-22.
- Benson, D. L. and Salton, S. R.** (1996). Expression and polarization of VGF in developing hippocampal neurons. *Brain Res Dev Brain Res* **96**, 219-28.
- Berridge, M. J.** (1990a). Calcium oscillations. *J Biol Chem* **265**, 9583-6.
- Berridge, M. J.** (1990b). Temporal aspects of calcium signalling. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **24**, 108-14.
- Berridge, M. J.** (2004). Calcium signal transduction and cellular control mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1742**, 3-7.
- Berridge, M. J., Lipp, P. and Bootman, M. D.** (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 11-21.
- Berton, F., Cornet, V., Iborra, C., Garrido, J., Dargent, B., Fukuda, M., Seagar, M. and Marqueze, B.** (2000). Synaptotagmin I and IV define distinct populations of neuronal transport vesicles. *Eur J Neurosci* **12**, 1294-302.
- Berton, F., Iborra, C., Boudier, J. A., Seagar, M. J. and Marqueze, B.** (1997). Developmental regulation of synaptotagmin I, II, III, and IV mRNAs in the rat CNS. *J Neurosci* **17**, 1206-16.

- Bhalla, A., Chicka, M. C., Tucker, W. C. and Chapman, E. R.** (2006).  $\text{Ca}^{2+}$ -synaptotagmin directly regulates t-SNARE function during reconstituted membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 323-30.
- Bhalla, A., Tucker, W. C. and Chapman, E. R.** (2005). Synaptotagmin isoforms couple distinct ranges of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ , and  $\text{Sr}^{2+}$  concentration to SNARE-mediated membrane fusion. *Mol Biol Cell* **16**, 4755-64.
- Binz, T., Blasi, J., Yamasaki, S., Baumeister, A., Link, E., Sudhof, T. C., Jahn, R. and Niemann, H.** (1994). Proteolysis of SNAP-25 by types E and A botulinum neurotoxins. *J Biol Chem* **269**, 1617-20.
- Blasi, J., Binz, T., Yamasaki, S., Link, E., Niemann, H. and Jahn, R.** (1994). Inhibition of neurotransmitter release by clostridial neurotoxins correlates with specific proteolysis of synaptosomal proteins. *J Physiol Paris* **88**, 235-41.
- Block, M. R., Glick, B. S., Wilcox, C. A., Wieland, F. T. and Rothman, J. E.** (1988). Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 7852-6.
- Boal, F., Zhang, H., Tessier, C., Scotti, P. and Lang, J.** (2004a). The variable C-terminus of cysteine string proteins modulates exocytosis and protein-protein interactions. *Biochemistry* **43**, 16212-23.
- Bock, J. B., Matern, H. T., Peden, A. A. and Scheller, R. H.** (2001). A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* **409**, 839-41.
- Bollmann, J. H., Sakmann, B. and Borst, J. G.** (2000). Calcium sensitivity of glutamate release in a calyx-type terminal. *Science* **289**, 953-7.
- Bommert, K., Charlton, M. P., DeBello, W. M., Chin, G. J., Betz, H. and Augustine, G. J.** (1993). Inhibition of neurotransmitter release by C2-domain peptides implicates synaptotagmin in exocytosis. *Nature* **363**, 163-5.
- Borge, P. D., Moibi, J., Greene, S. R., Trucco, M., Young, R. A., Gao, Z. and Wolf, B. A.** (2002). Insulin receptor signaling and sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase in beta-cells. *Diabetes* **51 Suppl 3**, S427-33.
- Bowen, M. E., Weninger, K., Ernst, J., Chu, S. and Brunger, A. T.** (2005). Single-molecule studies of synaptotagmin and complexin binding to the SNARE complex. *Biophys J* **89**, 690-702.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Braun, M., Wendt, A., Birnir, B., Broman, J., Eliasson, L., Galvanovskis, J., Gromada, J., Mulder, H. and Rorsman, P.** (2004). Regulated exocytosis of GABA-containing synaptic-like microvesicles in pancreatic beta-cells. *J Gen Physiol* **123**, 191-204.



- Brose, N., Petrenko, A. G., Sudhof, T. C. and Jahn, R.** (1992). Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* **256**, 1021-5.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R. and Agami, R.** (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**, 550-3.
- Brunger, A. T.** (2006). Structure and function of SNARE and SNARE-interacting proteins. *Q Rev Biophys* **38**, 1-47.
- Burgoyne, R. D. and Morgan, A.** (1998). Calcium sensors in regulated exocytosis. *Cell Calcium* **24**, 367-76.
- Burgoyne, R. D. and Morgan, A.** (2003). Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev* **83**, 581-632.
- Butz, S., Fernandez-Chacon, R., Schmitz, F., Jahn, R. and Sudhof, T. C.** (1999). The subcellular localizations of atypical synaptotagmins III and VI. Synaptotagmin III is enriched in synapses and synaptic plasma membranes but not in synaptic vesicles. *J Biol Chem* **274**, 18290-6.

## C

- Caler, E. V., Chakrabarti, S., Fowler, K. T., Rao, S. and Andrews, N. W.** (2001). The Exocytosis-regulatory protein synaptotagmin VII mediates cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med* **193**, 1097-104.
- Carpenter, L., Mitchell, C. J., Xu, Z. Z., Poronnik, P., Both, G. W. and Biden, T. J.** (2004). PKC alpha is activated but not required during glucose-induced insulin secretion from rat pancreatic islets. *Diabetes* **53**, 53-60.
- Catterall, W. A.** (1999). Interactions of presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels and snare proteins in neurotransmitter release. *Ann N Y Acad Sci* **868**, 144-59.
- Ceccarelli, B., Hurlbut, W. P. and Mauro, A.** (1973). Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* **57**, 499-524.
- Chakrabarti, S., Kobayashi, K. S., Flavell, R. A., Marks, C. B., Miyake, K., Liston, D. R., Fowler, K. T., Gorelick, F. S. and Andrews, N. W.** (2003). Impaired membrane resealing and autoimmune myositis in synaptotagmin VII-deficient mice. *J Cell Biol* **162**, 543-9.
- Chapman, E. R., Blasi, J., An, S., Brose, N., Johnston, P. A., Sudhof, T. C. and Jahn, R.** (1996). Fatty acylation of synaptotagmin in PC12 cells and synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun* **225**, 326-32.
- Chapman, E. R. and Davis, A. F.** (1998). Direct interaction of a Ca<sup>2+</sup>-binding loop of synaptotagmin with lipid bilayers. *J Biol Chem* **273**, 13995-4001.

- Chapman, E. R., Desai, R. C., Davis, A. F. and Tornehl, C. K.** (1998). Delineation of the oligomerization, AP-2 binding, and synprint binding region of the C2B domain of synaptotagmin. *J Biol Chem* **273**, 32966-72.
- Chapman, E. R., Hanson, P. I., An, S. and Jahn, R.** (1995).  $\text{Ca}^{2+}$  regulates the interaction between synaptotagmin and syntaxin 1. *J Biol Chem* **270**, 23667-71.
- Chapman, E. R. and Jahn, R.** (1994). Calcium-dependent interaction of the cytoplasmic region of synaptotagmin with membranes. Autonomous function of a single C2-homologous domain. *J Biol Chem* **269**, 5735-41.
- Charvin, N., L'Eveque, C., Walker, D., Berton, F., Raymond, C., Kataoka, M., Shoji-Kasai, Y., Takahashi, M., De Waard, M. and Seagar, M. J.** (1997). Direct interaction of the calcium sensor protein synaptotagmin I with a cytoplasmic domain of the alpha1A subunit of the P/Q-type calcium channel. *Embo J* **16**, 4591-6.
- Cheatham, B. and Kahn, C. R.** (1995). Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev* **16**, 117-42.
- Cheatham, B., Volchuk, A., Kahn, C. R., Wang, L., Rhodes, C. J. and Klip, A.** (1996). Insulin-stimulated translocation of GLUT4 glucose transporters requires SNARE-complex proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 15169-73.
- Chen, Y. A., Duvvuri, V., Schulman, H. and Scheller, R. H.** (1999). Calmodulin and protein kinase C increase  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated secretion by modulating membrane-attached exocytic machinery. *J Biol Chem* **274**, 26469-76.
- Chen, Y. A., Scales, S. J., Duvvuri, V., Murthy, M., Patel, S. M., Schulman, H. and Scheller, R. H.** (2001). Calcium regulation of exocytosis in PC12 cells. *J Biol Chem* **276**, 26680-7.
- Cheviet, S., Coppola, T. and Regazzi, R.** (2005). Functional assays for the investigation of the role of Rab GTPase effectors in dense core granule release. *Methods Enzymol* **403**, 57-71.
- Chieriegatti, E., Chicka, M. C., Chapman, E. R. and Baldini, G.** (2004). SNAP-23 functions in docking/fusion of granules at low  $\text{Ca}^{2+}$ . *Mol Biol Cell* **15**, 1918-30.
- Chieriegatti, E., Witkin, J. W. and Baldini, G.** (2002). SNAP-25 and synaptotagmin 1 function in  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent reversible docking of granules to the plasma membrane. *Traffic* **3**, 496-511.
- Clary, D. O., Griff, I. C. and Rothman, J. E.** (1990). SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell* **61**, 709-21.
- Cohen, R. and Atlas, D.** (2004). R-type voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channel interacts with synaptic proteins and recruits synaptotagmin to the plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *Neuroscience* **128**, 831-41.

- Cohen, R., Elferink, L. A. and Atlas, D.** (2003). The C2A domain of synaptotagmin alters the kinetics of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels Ca(v)1.2 (Lc-type) and Ca(v)2.3 (R-type). *J Biol Chem* **278**, 9258-66.
- Corkey, B. E., Deeney, J. T., Yaney, G. C., Tornheim, K. and Prentki, M.** (2000). The role of long-chain fatty acyl-CoA esters in beta-cell signal transduction. *J Nutr* **130**, 299S-304S.
- Corkey, B. E., Glennon, M. C., Chen, K. S., Deeney, J. T., Matschinsky, F. M. and Prentki, M.** (1989). A role for malonyl-CoA in glucose-stimulated insulin secretion from clonal pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* **264**, 21608-12.
- Craxton, M.** (2001). Genomic analysis of synaptotagmin genes. *Genomics* **77**, 43-9.
- Craxton, M.** (2004). Synaptotagmin gene content of the sequenced genomes. *BMC Genomics* **5**, 43.
- Craxton, M. and Goedert, M.** (1995). Synaptotagmin V: a novel synaptotagmin isoform expressed in rat brain. *FEBS Lett* **361**, 196-200.
- Craxton, M. and Goedert, M.** (1999). Alternative splicing of synaptotagmins involving transmembrane exon skipping. *FEBS Lett* **460**, 417-22.
- Creutz, C. E., Snyder, S. L. and Schulz, T. A.** (2004). Characterization of the yeast tricalbins: membrane-bound multi-C2-domain proteins that form complexes involved in membrane trafficking. *Cell Mol Life Sci* **61**, 1208-20.
- Crumpton, M. J. and Dedman, J. R.** (1990). Protein terminology tangle. *Nature* **345**, 212.
- Czibener, C., Sherer, N. M., Becker, S. M., Pypaert, M., Hui, E., Chapman, E. R., Mothes, W. and Andrews, N. W.** (2006).  $\text{Ca}^{2+}$  and synaptotagmin VII-dependent delivery of lysosomal membrane to nascent phagosomes. *J Cell Biol* **574**, 197.

## D

- Davalli, A. M., Biancardi, E., Pollo, A., Socci, C., Pontiroli, A. E., Pozza, G., Clementi, F., Sher, E. and Carbone, E.** (1996). Dihydropyridine-sensitive and -insensitive voltage-operated calcium channels participate in the control of glucose-induced insulin release from human pancreatic beta cells. *J Endocrinol* **150**, 195-203.
- Davletov, B., Sontag, J. M., Hata, Y., Petrenko, A. G., Fykse, E. M., Jahn, R. and Sudhof, T. C.** (1993). Phosphorylation of synaptotagmin I by casein kinase II. *J Biol Chem* **268**, 6816-22.
- Davletov, B. A. and Sudhof, T. C.** (1993). A single C2 domain from synaptotagmin I is sufficient for high affinity  $\text{Ca}^{2+}$ /phospholipid binding. *J Biol Chem* **268**, 26386-90.
- Dawson, A. P.** (1990). Regulation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . *Essays Biochem* **25**, 1-37.

- De Haro, L., Quetglas, S., Iborra, C., Leveque, C. and Seagar, M.** (2003). Calmodulin-dependent regulation of a lipid binding domain in the v-SNARE synaptobrevin and its role in vesicular fusion. *Biol Cell* **95**, 459-64.
- Debuyser, A., Drews, G. and Henquin, J. C.** (1991a). Adrenaline inhibition of insulin release: role of cyclic AMP. *Mol Cell Endocrinol* **78**, 179-86.
- Debuyser, A., Drews, G. and Henquin, J. C.** (1991b). Adrenaline inhibition of insulin release: role of the repolarization of the B cell membrane. *Pflugers Arch* **419**, 131-7.
- Deeney, J. T., Gromada, J., Hoy, M., Olsen, H. L., Rhodes, C. J., Prentki, M., Berggren, P. O. and Corkey, B. E.** (2000a). Acute stimulation with long chain acyl-CoA enhances exocytosis in insulin-secreting cells (HIT T-15 and NMRI beta-cells). *J Biol Chem* **275**, 9363-8.
- Deeney, J. T., Prentki, M. and Corkey, B. E.** (2000b). Metabolic control of beta-cell function. *Semin Cell Dev Biol* **11**, 267-75.
- DiAntonio, A., Parfitt, K. D. and Schwarz, T. L.** (1993). Synaptic transmission persists in synaptotagmin mutants of *Drosophila*. *Cell* **73**, 1281-90.
- DiAntonio, A. and Schwarz, T. L.** (1994). The effect on synaptic physiology of synaptotagmin mutations in *Drosophila*. *Neuron* **12**, 909-20.
- Dodson, G. and Steiner, D.** (1998). The role of assembly in insulin's biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol* **8**, 189-94.
- Donelan, M. J., Morfini, G., Julyan, R., Sommers, S., Hays, L., Kajio, H., Briaud, I., Easom, R. A., Molkenin, J. D., Brady, S. T. et al.** (2002). Ca<sup>2+</sup>-dependent dephosphorylation of kinesin heavy chain on beta-granules in pancreatic beta-cells. Implications for regulated beta-granule transport and insulin exocytosis. *J Biol Chem* **277**, 24232-42.
- Du, Q., Thonberg, H., Wang, J., Wahlestedt, C. and Liang, Z.** (2005). A systematic analysis of the silencing effects of an active siRNA at all single-nucleotide mismatched target sites. *Nucleic Acids Res* **33**, 1671-7.
- Dulubova, I., Sugita, S., Hill, S., Hosaka, M., Fernandez, I., Sudhof, T. C. and Rizo, J.** (1999). A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *Embo J* **18**, 4372-82.

## E

- Earles, C. A., Bai, J., Wang, P. and Chapman, E. R.** (2001). The tandem C2 domains of synaptotagmin contain redundant Ca<sup>2+</sup> binding sites that cooperate to engage t-SNAREs and trigger exocytosis. *J Cell Biol* **154**, 1117-23.

- Eberhard, D. A., Cooper, C. L., Low, M. G. and Holz, R. W.** (1990). Evidence that the inositol phospholipids are necessary for exocytosis. Loss of inositol phospholipids and inhibition of secretion in permeabilized cells caused by a bacterial phospholipase C and removal of ATP. *Biochem J* **268**, 15-25.
- Edwards, A. S. and Newton, A. C.** (1997). Regulation of protein kinase C betaII by its C2 domain. *Biochemistry* **36**, 15615-23.
- Elghazi, L., Balcazar, N. and Bernal-Mizrachi, E.** (2006). Emerging role of protein kinase B/Akt signaling in pancreatic beta-cell mass and function. *Int J Biochem Cell Biol* **38**, 157-63.
- Eliasson, L., Renstrom, E., Ding, W. G., Proks, P. and Rorsman, P.** (1997). Rapid ATP-dependent priming of secretory granules precedes Ca<sup>2+</sup>-induced exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol* **503 ( Pt 2)**, 399-412.
- Evans, G. J., Barclay, J. W., Prescott, G. R., Jo, S. R., Burgoyne, R. D., Birnbaum, M. J. and Morgan, A.** (2006). Protein kinase B/Akt is a novel cysteine string protein kinase that regulates exocytosis release kinetics and quantal size. *J Biol Chem* **281**, 1564-72.
- Evans, G. J., Wilkinson, M. C., Graham, M. E., Turner, K. M., Chamberlain, L. H., Burgoyne, R. D. and Morgan, A.** (2001). Phosphorylation of cysteine string protein by protein kinase A. Implications for the modulation of exocytosis. *J Biol Chem* **276**, 47877-85.
- Evans, J. H., Gerber, S. H., Murray, D. and Leslie, C. C.** (2004). The calcium binding loops of the cytosolic phospholipase A2 C2 domain specify targeting to Golgi and ER in live cells. *Mol Biol Cell* **15**, 371-83.

## F

- Fernandez, I., Arac, D., Ubach, J., Gerber, S. H., Shin, O., Gao, Y., Anderson, R. G., Sudhof, T. C. and Rizo, J.** (2001). Three-dimensional structure of the synaptotagmin 1 C2B-domain: synaptotagmin 1 as a phospholipid binding machine. *Neuron* **32**, 1057-69.
- Fernandez, I., Ubach, J., Dulubova, I., Zhang, X., Sudhof, T. C. and Rizo, J.** (1998). Three-dimensional structure of an evolutionarily conserved N-terminal domain of syntaxin 1A. *Cell* **94**, 841-9.
- Fernandez-Chacon, R., Konigstorfer, A., Gerber, S. H., Garcia, J., Matos, M. F., Stevens, C. F., Brose, N., Rizo, J., Rosenmund, C. and Sudhof, T. C.** (2001). Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature* **410**, 41-9.
- Fernandez-Chacon, R., Shin, O. H., Konigstorfer, A., Matos, M. F., Meyer, A. C., Garcia, J., Gerber, S. H., Rizo, J., Sudhof, T. C. and Rosenmund, C.** (2002). Structure/function analysis of Ca<sup>2+</sup> binding to the C2A domain of synaptotagmin 1. *J Neurosci* **22**, 8438-46.

- Fiebig, K. M., Rice, L. M., Pollock, E. and Brunger, A. T.** (1999). Folding intermediates of SNARE complex assembly. *Nat Struct Biol* **6**, 117-23.
- Fisher, R. J., Pevsner, J. and Burgoyne, R. D.** (2001). Control of fusion pore dynamics during exocytosis by Munc18. *Science* **291**, 875-8.
- Fisher, T. E. and Bourque, C. W.** (2001). The function of Ca<sup>2+</sup> channel subtypes in exocytotic secretion: new perspectives from synaptic and non-synaptic release. *Prog Biophys Mol Biol* **77**, 269-303.
- Frazier, A. A., Roller, C. R., Havelka, J. J., Hinderliter, A. and Cafiso, D. S.** (2003). Membrane-bound orientation and position of the synaptotagmin I C2A domain by site-directed spin labeling. *Biochemistry* **42**, 96-105.
- Fukuda, M.** (2002). Vesicle-associated membrane protein-2/synaptobrevin binding to synaptotagmin I promotes O-glycosylation of synaptotagmin I. *J Biol Chem* **277**, 30351-8.
- Fukuda, M.** (2003a). Molecular cloning and characterization of human, rat, and mouse synaptotagmin XV. *Biochem Biophys Res Commun* **306**, 64-71.
- Fukuda, M.** (2003b). Molecular cloning, expression, and characterization of a novel class of synaptotagmin (Syt XIV) conserved from *Drosophila* to humans. *J Biochem (Tokyo)* **133**, 641-9.
- Fukuda, M.** (2004). RNA interference-mediated silencing of synaptotagmin IX, but not synaptotagmin I, inhibits dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *Biochem J* **380**, 875-9.
- Fukuda, M.** (2006). Distinct developmental expression of synaptotagmin I and IX in the mouse brain. *Neuroreport* **17**, 179-82.
- Fukuda, M., Aruga, J., Niinobe, M., Aimoto, S. and Mikoshiba, K.** (1994). Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate binding to C2B domain of IP4BP/synaptotagmin II. *J Biol Chem* **269**, 29206-11.
- Fukuda, M., Kanno, E. and Mikoshiba, K.** (1999). Conserved N-terminal cysteine motif is essential for homo- and heterodimer formation of synaptotagmins III, V, VI, and X. *J Biol Chem* **274**, 31421-7.
- Fukuda, M., Kanno, E., Ogata, Y. and Mikoshiba, K.** (2001). Mechanism of the SDS-resistant synaptotagmin clustering mediated by the cysteine cluster at the interface between the transmembrane and spacer domains. *J Biol Chem* **276**, 40319-25.
- Fukuda, M., Kanno, E., Ogata, Y., Saegusa, C., Kim, T., Loh, Y. P. and Yamamoto, A.** (2003). Nerve growth factor-dependent sorting of synaptotagmin IV protein to mature dense-core vesicles that undergo calcium-dependent exocytosis in PC12 cells. *J Biol Chem* **278**, 3220-6.

- Fukuda, M., Kanno, E., Satoh, M., Saegusa, C. and Yamamoto, A.** (2004). Synaptotagmin VII is targeted to dense-core vesicles and regulates their Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis in PC12 cells. *J Biol Chem* **279**, 52677-84.
- Fukuda, M., Kojima, T., Aruga, J., Niinobe, M. and Mikoshiba, K.** (1995a). Functional diversity of C2 domains of synaptotagmin family. Mutational analysis of inositol high polyphosphate binding domain. *J Biol Chem* **270**, 26523-7.
- Fukuda, M., Kojima, T. and Mikoshiba, K.** (1996). Phospholipid composition dependence of Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipid binding to the C2A domain of synaptotagmin IV. *J Biol Chem* **271**, 8430-4.
- Fukuda, M., Kowalchuk, J. A., Zhang, X., Martin, T. F. and Mikoshiba, K.** (2002a). Synaptotagmin IX regulates Ca<sup>2+</sup>-dependent secretion in PC12 cells. *J Biol Chem* **277**, 4601-4.
- Fukuda, M. and Mikoshiba, K.** (1999). A novel alternatively spliced variant of synaptotagmin VI lacking a transmembrane domain. Implications for distinct functions of the two isoforms. *J Biol Chem* **274**, 31428-34.
- Fukuda, M. and Mikoshiba, K.** (2000a). Distinct self-oligomerization activities of synaptotagmin family. Unique calcium-dependent oligomerization properties of synaptotagmin VII. *J Biol Chem* **275**, 28180-5.
- Fukuda, M. and Mikoshiba, K.** (2000b). Genomic structures of synaptotagmin II protein: comparison of exon-intron organization of the synaptotagmin gene family. *Biochem Biophys Res Commun* **270**, 528-32.
- Fukuda, M. and Mikoshiba, K.** (2001a). Characterization of KIAA1427 protein as an atypical synaptotagmin (Syt XIII). *Biochem J* **354**, 249-57.
- Fukuda, M. and Mikoshiba, K.** (2001b). Mechanism of the calcium-dependent multimerization of synaptotagmin VII mediated by its first and second C2 domains. *J Biol Chem* **276**, 27670-6.
- Fukuda, M., Moreira, J. E., Lewis, F. M., Sugimori, M., Niinobe, M., Mikoshiba, K. and Llinas, R.** (1995b). Role of the C2B domain of synaptotagmin in vesicular release and recycling as determined by specific antibody injection into the squid giant synapse preterminal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10708-12.
- Fukuda, M., Moreira, J. E., Liu, V., Sugimori, M., Mikoshiba, K. and Llinas, R. R.** (2000). Role of the conserved WHXL motif in the C terminus of synaptotagmin in synaptic vesicle docking. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14715-9.
- Fukuda, M., Ogata, Y., Saegusa, C., Kanno, E. and Mikoshiba, K.** (2002b). Alternative splicing isoforms of synaptotagmin VII in the mouse, rat and human. *Biochem J* **365**, 173-80.

## G

- Galione, A. and Churchill, G. C.** (2002). Interactions between calcium release pathways: multiple messengers and multiple stores. *Cell Calcium* **32**, 343-54.
- Gao, Z., Reavey-Cantwell, J., Young, R. A., Jegier, P. and Wolf, B. A.** (2000). Synaptotagmin III/VII isoforms mediate  $Ca^{2+}$ -induced insulin secretion in pancreatic islet beta -cells. *J Biol Chem* **275**, 36079-85.
- Garcia, R. A., Forde, C. E. and Godwin, H. A.** (2000). Calcium triggers an intramolecular association of the C2 domains in synaptotagmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5883-8.
- Geppert, M., Archer, B. T., 3rd and Sudhof, T. C.** (1991). Synaptotagmin II. A novel differentially distributed form of synaptotagmin. *J Biol Chem* **266**, 13548-52.
- Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R. E., Li, C., Rosahl, T. W., Stevens, C. F. and Sudhof, T. C.** (1994). Synaptotagmin I: a major  $Ca^{2+}$  sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* **79**, 717-27.
- Gerber, S. H., Rizo, J. and Sudhof, T. C.** (2001). The top loops of the C(2) domains from synaptotagmin and phospholipase A(2) control functional specificity. *J Biol Chem* **276**, 32288-92.
- Gerber, S. H. and Sudhof, T. C.** (2002). Molecular determinants of regulated exocytosis. *Diabetes* **51 Suppl 1**, S3-11.
- Gerona, R. R., Larsen, E. C., Kowalchyk, J. A. and Martin, T. F.** (2000). The C terminus of SNAP25 is essential for  $Ca^{2+}$ -dependent binding of synaptotagmin to SNARE complexes. *J Biol Chem* **275**, 6328-36.
- Gerst, J. E.** (2003). SNARE regulators: matchmakers and matchbreakers. *Biochim Biophys Acta* **1641**, 99-110.
- Gilon, P. and Henquin, J. C.** (2001). Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocr Rev* **22**, 565-604.
- Glass, A. S., Huynh, D. P., Franck, T., Weitalla, D., Muller, T., Pulst, S. M., Berg, D., Kruger, R. and Riess, O.** (2004). Screening for mutations in synaptotagmin XI in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, 21-8.
- Gopel, S., Zhang, Q., Eliasson, L., Ma, X. S., Galvanovskis, J., Kanno, T., Salehi, A. and Rorsman, P.** (2004). Capacitance measurements of exocytosis in mouse pancreatic alpha-, beta- and delta-cells within intact islets of Langerhans. *J Physiol* **556**, 711-26.
- Graham, M. E., Barclay, J. W. and Burgoyne, R. D.** (2004). Syntaxin/Munc18 interactions in the late events during vesicle fusion and release in exocytosis. *J Biol Chem* **279**, 32751-60.



- Graham, M. E. and Burgoyne, R. D.** (2000). Comparison of cysteine string protein (Csp) and mutant alpha-SNAP overexpression reveals a role for csp in late steps of membrane fusion in dense-core granule exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* **20**, 1281-9.
- Graham, M. E., Washbourne, P., Wilson, M. C. and Burgoyne, R. D.** (2001). SNAP-25 with mutations in the zero layer supports normal membrane fusion kinetics. *J Cell Sci* **114**, 4397-405.
- Graham, M. E., Washbourne, P., Wilson, M. C. and Burgoyne, R. D.** (2002). Molecular analysis of SNAP-25 function in exocytosis. *Ann N Y Acad Sci* **971**, 210-21.
- Grimberg, E., Peng, Z., Hammel, I. and Sagi-Eisenberg, R.** (2003). Synaptotagmin III is a critical factor for the formation of the perinuclear endocytic recycling compartment and determination of secretory granules size. *J Cell Sci* **116**, 145-54.
- Grishanin, R. N., Kowalchuk, J. A., Klenchin, V. A., Ann, K., Earles, C. A., Chapman, E. R., Gerona, R. R. and Martin, T. F.** (2004). CAPS acts at a pre-fusion step in dense-core vesicle exocytosis as a PIP2 binding protein. *Neuron* **43**, 551-62.
- Gromada, J., Ding, W. G., Barg, S., Renstrom, E. and Rorsman, P.** (1997). Multisite regulation of insulin secretion by cAMP-increasing agonists: evidence that glucagon-like peptide 1 and glucagon act via distinct receptors. *Pflugers Arch* **434**, 515-24.
- Gromada, J., Holst, J. J. and Rorsman, P.** (1998). Cellular regulation of islet hormone secretion by the incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Pflugers Arch* **435**, 583-94.
- Gromada, J., Hoy, M., Renstrom, E., Bokvist, K., Eliasson, L., Gopel, S. and Rorsman, P.** (1999). CaM kinase II-dependent mobilization of secretory granules underlies acetylcholine-induced stimulation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol* **518** ( Pt 3), 745-59.
- Gut, A., Kiraly, C. E., Fukuda, M., Mikoshiba, K., Wollheim, C. B. and Lang, J.** (2001). Expression and localisation of synaptotagmin isoforms in endocrine beta-cells: their function in insulin exocytosis. *J Cell Sci* **114**, 1709-16.

## H

- Haberman, Y., Grimberg, E., Fukuda, M. and Sagi-Eisenberg, R.** (2003). Synaptotagmin IX, a possible linker between the perinuclear endocytic recycling compartment and the microtubules. *J Cell Sci* **116**, 4307-18.
- Haberman, Y., Ziv, I., Gorzalczany, Y., Fukuda, M. and Sagi-Eisenberg, R.** (2005). Classical protein kinase C(s) regulates targeting of synaptotagmin IX to the endocytic recycling compartment. *J Cell Sci* **118**, 1641-9.

- Han, W., Rhee, J. S., Maximov, A., Lao, Y., Mashimo, T., Rosenmund, C. and Sudhof, T. C.** (2004a). N-glycosylation is essential for vesicular targeting of synaptotagmin 1. *Neuron* **41**, 85-99.
- Han, X., Wang, C. T., Bai, J., Chapman, E. R. and Jackson, M. B.** (2004b). Transmembrane segments of syntaxin line the fusion pore of Ca<sup>2+</sup>-triggered exocytosis. *Science* **304**, 289-92.
- Hay, J. C. and Martin, T. F.** (1992). Resolution of regulated secretion into sequential MgATP-dependent and calcium-dependent stages mediated by distinct cytosolic proteins. *J Cell Biol* **119**, 139-51.
- Hayashi, T., McMahon, H., Yamasaki, S., Binz, T., Hata, Y., Sudhof, T. C. and Niemann, H.** (1994). Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *Embo J* **13**, 5051-61.
- Heindel, U., Schmidt, M. F. and Veit, M.** (2003). Palmitoylation sites and processing of synaptotagmin I, the putative calcium sensor for neurosecretion. *FEBS Lett* **544**, 57-62.
- Henquin, J. C.** (2000). Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* **49**, 1751-60.
- Henquin, J. C., Ravier, M. A., Nenquin, M., Jonas, J. C. and Gilon, P.** (2003). Hierarchy of the beta-cell signals controlling insulin secretion. *Eur J Clin Invest* **33**, 742-50.
- Holz, R. W. and Axelrod, D.** (2002). Localization of phosphatidylinositol 4,5-P(2) important in exocytosis and a quantitative analysis of chromaffin granule motion adjacent to the plasma membrane. *Ann N Y Acad Sci* **971**, 232-43.
- Holz, R. W., Bittner, M. A., Peppers, S. C., Senter, R. A. and Eberhard, D. A.** (1989). MgATP-independent and MgATP-dependent exocytosis. Evidence that MgATP primes adrenal chromaffin cells to undergo exocytosis. *J Biol Chem* **264**, 5412-9.
- Holz, R. W., Hlubek, M. D., Sorensen, S. D., Fisher, S. K., Balla, T., Ozaki, S., Prestwich, G. D., Stuenkel, E. L. and Bittner, M. A.** (2000). A pleckstrin homology domain specific for phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PtdIns-4,5-P2) and fused to green fluorescent protein identifies plasma membrane PtdIns-4,5-P2 as being important in exocytosis. *J Biol Chem* **275**, 17878-85.
- Hsu, S. C., Hazuka, C. D., Foletti, D. L. and Scheller, R. H.** (1999). Targeting vesicles to specific sites on the plasma membrane: the role of the sec6/8 complex. *Trends Cell Biol* **9**, 150-3.
- Huang, X. F. and Arvan, P.** (1995). Intracellular transport of proinsulin in pancreatic beta-cells. Structural maturation probed by disulfide accessibility. *J Biol Chem* **270**, 20417-23.
- Hudson, A. W. and Birnbaum, M. J.** (1995). Identification of a nonneuronal isoform of synaptotagmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5895-9.

- Hui, E., Bai, J. and Chapman, E. R.** (2006).  $\text{Ca}^{2+}$  triggered simultaneous membrane penetration of the tandem C2 domains of synaptotagmin I. *Biophys J.*
- Hui, E., Bai, J., Wang, P., Sugimori, M., Llinas, R. R. and Chapman, E. R.** (2005). Three distinct kinetic groupings of the synaptotagmin family: candidate sensors for rapid and delayed exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 5210-4.
- Hutt, D. M., Baltz, J. M. and Ngsee, J. K.** (2005). Synaptotagmin VI and VIII and syntaxin 2 are essential for the mouse sperm acrosome reaction. *J Biol Chem* **280**, 20197-203.
- Hutt, D. M., Cardullo, R. A., Baltz, J. M. and Ngsee, J. K.** (2002). Synaptotagmin VIII is localized to the mouse sperm head and may function in acrosomal exocytosis. *Biol Reprod* **66**, 50-6.

## I

- Ibata, K., Fukuda, M., Hamada, T., Kabayama, H. and Mikoshiba, K.** (2000). Synaptotagmin IV is present at the Golgi and distal parts of neurites. *J Neurochem* **74**, 518-26.
- Ibata, K., Fukuda, M. and Mikoshiba, K.** (1998). Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate binding activities of neuronal and non-neuronal synaptotagmins. Identification of conserved amino acid substitutions that abolish inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate binding to synaptotagmins III, V, and X. *J Biol Chem* **273**, 12267-73.
- Iezzi, M., Eliasson, L., Fukuda, M. and Wollheim, C. B.** (2005a). Adenovirus-mediated silencing of synaptotagmin 9 inhibits  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent insulin secretion in islets. *FEBS Lett* **579**, 5241-6.
- 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**, 202-12.
- Iezzi, M., Kouri, G., Fukuda, M. and Wollheim, C. B.** (2004). Synaptotagmin V and IX isoforms control  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent insulin exocytosis. *J Cell Sci* **117**, 3119-27.
- Iezzi, M., Theander, S., Janz, R., Loze, C. and Wollheim, C. B.** (2005b). SV2A and SV2C are not vesicular  $\text{Ca}^{2+}$  transporters but control glucose-evoked granule recruitment. *J Cell Sci* **118**, 5647-5660.
- In't Veld, P.A., Pipeleers-Marichal, M., Pipeleers, D.G.** (1990). Les îlots de Langerhans. *Traité de diabétologie*
- Islam, M. S., Leibiger, I., Leibiger, B., Rossi, D., Sorrentino, V., Ekstrom, T. J., Westerblad, H., Andrade, F. H. and Berggren, P. O.** (1998). In situ activation of the type 2 ryanodine receptor in pancreatic beta cells requires cAMP-dependent phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6145-50.

## J

- Jacobsson, G., Bean, A. J., Scheller, R. H., Juntti-Berggren, L., Deeney, J. T., Berggren, P. O. and Meister, B.** (1994). Identification of synaptic proteins and their isoform mRNAs in compartments of pancreatic endocrine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12487-91.
- Jahn, R., Lang, T. and Sudhof, T. C.** (2003). Membrane fusion. *Cell* **112**, 519-33.
- Jaiswal, J. K., Chakrabarti, S., Andrews, N. W. and Simon, S. M.** (2004). Synaptotagmin VII restricts fusion pore expansion during lysosomal exocytosis. *PLoS Biol* **2**, E233.
- Jimenez, J. L., Smith, G. R., Contreras-Moreira, B., Sgouros, J. G., Meunier, F. A., Bates, P. A. and Schiavo, G.** (2003). Functional recycling of C2 domains throughout evolution: a comparative study of synaptotagmin, protein kinase C and phospholipase C by sequence, structural and modelling approaches. *J Mol Biol* **333**, 621-39.
- Jing, X., Li, D. Q., Olofsson, C. S., Salehi, A., Surve, V. V., Caballero, J., Ivarsson, R., Lundquist, I., Pereverzev, A., Schneider, T. et al.** (2005). CaV2.3 calcium channels control second-phase insulin release. *J Clin Invest* **115**, 146-54.
- Johnson, J. H., Newgard, C. B., Milburn, J. L., Lodish, H. F. and Thorens, B.** (1990). The high Km glucose transporter of islets of Langerhans is functionally similar to the low affinity transporter of liver and has an identical primary sequence. *J Biol Chem* **265**, 6548-51.
- Jones, K. A., Jiang, X., Yamamoto, Y. and Yeung, R. S.** (2004). Tuberin is a component of lipid rafts and mediates caveolin-1 localization: role of TSC2 in post-Golgi transport. *Exp Cell Res* **295**, 512-24.
- Joost, H. G., Bell, G. I., Best, J. D., Birnbaum, M. J., Charron, M. J., Chen, Y. T., Doege, H., James, D. E., Lodish, H. F., Moley, K. H. et al.** (2002). Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E974-6.
- Jorgensen, E. M., Hartweg, E., Schuske, K., Nonet, M. L., Jin, Y. and Horvitz, H. R.** (1995). Defective recycling of synaptic vesicles in synaptotagmin mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **378**, 196-9.

## K

- Kakhlon, O., Sakya, P., Larijani, B., Watson, R. and Tooze, S. A.** (2006). GGA function is required for maturation of neuroendocrine secretory granules. *Embo J* **25**, 1590-602.
- Kang, R., Swayze, R., Lise, M. F., Gerrow, K., Mullard, A., Honer, W. G. and El-Husseini, A.** (2004). Presynaptic trafficking of synaptotagmin I is regulated by protein palmitoylation. *J Biol Chem* **279**, 50524-36.

- Kang, Y., Huang, X., Pasyk, E. A., Ji, J., Holz, G. G., Wheeler, M. B., Tsushima, R. G. and Gaisano, H. Y.** (2002). Syntaxin-3 and syntaxin-1A inhibit L-type calcium channel activity, insulin biosynthesis and exocytosis in beta-cell lines. *Diabetologia* **45**, 231-41.
- Kasai, K., Ohara-Imaizumi, M., Takahashi, N., Mizutani, S., Zhao, S., Kikuta, T., Kasai, H., Nagamatsu, S., Gomi, H. and Izumi, T.** (2005). Rab27a mediates the tight docking of insulin granules onto the plasma membrane during glucose stimulation. *J Clin Invest* **115**, 388-96.
- Kee, Y. and Scheller, R. H.** (1996). Localization of synaptotagmin-binding domains on syntaxin. *J Neurosci* **16**, 1975-81.
- Kennedy, E. D., Maechler, P. and Wollheim, C. B.** (1998). Effects of depletion of mitochondrial DNA in metabolism secretion coupling in INS-1 cells. *Diabetes* **47**, 374-80.
- Kirichok, Y., Krapivinsky, G. and Clapham, D. E.** (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* **427**, 360-4.
- Kishore, B. K., Wade, J. B., Schorr, K., Inoue, T., Mandon, B. and Knepper, M. A.** (1998). Expression of synaptotagmin VIII in rat kidney. *Am J Physiol* **275**, F131-42.
- Klenchin, V. A. and Martin, T. F.** (2000). Priming in exocytosis: attaining fusion-competence after vesicle docking. *Biochimie* **82**, 399-407.
- Knoch, K. P., Meisterfeld, R., Kersting, S., Bergert, H., Altkruger, A., Wegbrod, C., Jager, M., Saeger, H. D. and Solimena, M.** (2006). cAMP-dependent phosphorylation of PTB1 promotes the expression of insulin secretory granule proteins in beta cells. *Cell Metab* **3**, 123-34.
- Koh, T. W. and Bellen, H. J.** (2003). Synaptotagmin I, a Ca<sup>2+</sup> sensor for neurotransmitter release. *Trends Neurosci* **26**, 413-22.
- Kuliawat, R., Kalinina, E., Bock, J., Fricker, L., McGraw, T. E., Kim, S. R., Zhong, J., Scheller, R. and Arvan, P.** (2004). Syntaxin-6 SNARE involvement in secretory and endocytic pathways of cultured pancreatic beta-cells. *Mol Biol Cell* **15**, 1690-701.

## L

- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lafont, F., Lecat, S., Verkade, P. and Simons, K.** (1998). Annexin XIIIb associates with lipid microdomains to function in apical delivery. *J Cell Biol* **142**, 1413-27.

- Lajus, S., Vacher, P., Huber, D., Dubois, M., Benassy, M. N., Ushkaryov, Y. and Lang, J.** (2006). Alpha-latrotoxin induces exocytosis by inhibition of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels and by stimulation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels via latrophilin in beta-cells. *J Biol Chem* **281**, 5522-31.
- Lang, J.** (2003). PIPs and pools in insulin secretion. *Trends Endocrinol Metab* **14**, 297-9.
- Lang, J., Fukuda, M., Zhang, H., Mikoshiba, K. and Wollheim, C. B.** (1997a). The first C2 domain of synaptotagmin is required for exocytosis of insulin from pancreatic beta-cells: action of synaptotagmin at low micromolar calcium. *EMBO J* **16**, 5837-46.
- Lang, J., Nishimoto, I., Okamoto, T., Regazzi, R., Kiraly, C., Weller, U. and Wollheim, C. B.** (1995). Direct control of exocytosis by receptor-mediated activation of the heterotrimeric GTPases Gi and G(o) or by the expression of their active G alpha subunits. *Embo J* **14**, 3635-44.
- Lang, J., Zhang, H., Vaidyanathan, V. V., Sadoul, K., Niemann, H. and Wollheim, C. B.** (1997b). Transient expression of botulinum neurotoxin C1 light chain differentially inhibits calcium and glucose induced insulin secretion in clonal beta-cells. *FEBS Lett* **419**, 13-7.
- Lee, B. H., Min, X., Heise, C. J., Xu, B. E., Chen, S., Shu, H., Luby-Phelps, K., Goldsmith, E. J. and Cobb, M. H.** (2004). WNK1 phosphorylates synaptotagmin 2 and modulates its membrane binding. *Mol Cell* **15**, 741-51.
- Lee, H. C.** (1997). Mechanisms of calcium signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP. *Physiol Rev* **77**, 1133-64.
- Lemmens, R., Larsson, O., Berggren, P. O. and Islam, M. S.** (2001). Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release from the endoplasmic reticulum amplifies the Ca<sup>2+</sup> signal mediated by activation of voltage-gated L-type Ca<sup>2+</sup> channels in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* **276**, 9971-7.
- Leveque, C., el Far, O., Martin-Moutot, N., Sato, K., Kato, R., Takahashi, M. and Seagar, M. J.** (1994). Purification of the N-type calcium channel associated with syntaxin and synaptotagmin. A complex implicated in synaptic vesicle exocytosis. *J Biol Chem* **269**, 6306-12.
- Li, C., Ullrich, B., Zhang, J. Z., Anderson, R. G., Brose, N. and Sudhof, T. C.** (1995). Ca<sup>2+</sup>-dependent and -independent activities of neural and non-neural synaptotagmins. *Nature* **375**, 594-9.
- Li, G., Rungger-Brandle, E., Just, I., Jonas, J. C., Aktories, K. and Wollheim, C. B.** (1994). Effect of disruption of actin filaments by Clostridium botulinum C2 toxin on insulin secretion in HIT-T15 cells and pancreatic islets. *Mol Biol Cell* **5**, 1199-213.
- Li, L., Shin, O. H., Rhee, J. S., Arac, D., Rah, J. C., Rizo, J., Sudhof, T. and Rosenmund, C.** (2006). Phosphatidylinositol phosphates as co-activators of Ca<sup>2+</sup> binding to C2 domains of synaptotagmin 1. *J Biol Chem* **281**, 15845-52.

- Lindmark, I. M., Karlsson, A., Serrander, L., Francois, P., Lew, D., Rasmusson, B., Stendahl, O. and Nusse, O.** (2002). Synaptotagmin II could confer  $Ca^{2+}$  sensitivity to phagocytosis in human neutrophils. *Biochim Biophys Acta* **1590**, 159-66.
- Link, E., Blasi, J., Chapman, E. R., Edelmann, L., Baumeister, A., Binz, T., Yamasaki, S., Niemann, H. and Jahn, R.** (1994). Tetanus and botulinal neurotoxins. Tools to understand exocytosis in neurons. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **29**, 47-58.
- Littleton, J. T., Bai, J., Vyas, B., Desai, R., Baltus, A. E., Garment, M. B., Carlson, S. D., Ganetzky, B. and Chapman, E. R.** (2001). synaptotagmin mutants reveal essential functions for the C2B domain in  $Ca^{2+}$ -triggered fusion and recycling of synaptic vesicles in vivo. *J Neurosci* **21**, 1421-33.
- Littleton, J. T., Stern, M., Schulze, K., Perin, M. and Bellen, H. J.** (1993). Mutational analysis of *Drosophila* synaptotagmin demonstrates its essential role in  $Ca^{2+}$ -activated neurotransmitter release. *Cell* **74**, 1125-34.
- Llinas, R., Sugimori, M. and Silver, R. B.** (1992). Presynaptic calcium concentration microdomains and transmitter release. *J Physiol Paris* **86**, 135-8.
- Loewen, C. A., Lee, S. M., Shin, Y. K. and Reist, N. E.** (2006). Synaptotagmin's C2B Polylysine Motif Facilitates a  $Ca^{2+}$ -independent Stage of Synaptic Vesicle Priming In Vivo. *Mol Biol Cell*.

## M

- MacDonald, P. E. and Rorsman, P.** (2006). Oscillations, intercellular coupling, and insulin secretion in pancreatic Beta cells. *PLoS Biol* **4**, e49.
- Mackler, J. M., Drummond, J. A., Loewen, C. A., Robinson, I. M. and Reist, N. E.** (2002). The C(2)B  $Ca^{2+}$ -binding motif of synaptotagmin is required for synaptic transmission in vivo. *Nature* **418**, 340-4.
- Madsen, O. D., Jensen, J., Blume, N., Petersen, H. V., Lund, K., Karlsen, C., Andersen, F. G., Jensen, P. B., Larsson, L. I. and Serup, P.** (1996). Pancreatic development and maturation of the islet B cell. Studies of pluripotent islet cultures. In *Eur J Biochem*, vol. 242, pp. 435-45.
- Maechler, P., Gjinovci, A. and Wollheim, C. B.** (2002). Implication of glutamate in the kinetics of insulin secretion in rat and mouse perfused pancreas. *Diabetes* **51 Suppl 1**, S99-102.
- Maechler, P., Kennedy, E. D., Sebo, E., Valeva, A., Pozzan, T. and Wollheim, C. B.** (1999a). Secretagogues modulate the calcium concentration in the endoplasmic reticulum of insulin-secreting cells. Studies in aequorin-expressing intact and permeabilized ins-1 cells. *J Biol Chem* **274**, 12583-92.

- Maechler, P. and Wollheim, C. B.** (1999b). Mitochondrial glutamate acts as a messenger in glucose-induced insulin exocytosis. *Nature* **402**, 685-9.
- Mahal, L. K., Sequeira, S. M., Gureasko, J. M. and Sollner, T. H.** (2002). Calcium-independent stimulation of membrane fusion and SNAREpin formation by synaptotagmin I. *J Cell Biol* **158**, 273-82.
- Malenka, R. C. and Nicoll, R. A.** (1999). Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* **285**, 1870-4.
- Mankovsky, B. N. and Ziegler, D.** (2004). Stroke in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev* **20**, 268-87.
- Marqueze, B., Berton, F. and Seagar, M.** (2000). Synaptotagmins in membrane traffic: which vesicles do the tagmins tag? *Biochimie* **82**, 409-20.
- Marqueze, B., Boudier, J. A., Mizuta, M., Inagaki, N., Seino, S. and Seagar, M.** (1995). Cellular localization of synaptotagmin I, II, and III mRNAs in the central nervous system and pituitary and adrenal glands of the rat. *J Neurosci* **15**, 4906-17.
- Martin, F., Moya, F., Gutierrez, L. M., Reig, J. A. and Soria, B.** (1995). Role of syntaxin in mouse pancreatic beta cells. *Diabetologia* **38**, 860-3.
- Martinez, I., Chakrabarti, S., Hellevik, T., Morehead, J., Fowler, K. and Andrews, N. W.** (2000). Synaptotagmin VII regulates Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis of lysosomes in fibroblasts. *J Cell Biol* **148**, 1141-49.
- Matthew, W. D., Tsavaler, L. and Reichardt, L. F.** (1981). Identification of a synaptic vesicle-specific membrane protein with a wide distribution in neuronal and neurosecretory tissue. *J Cell Biol* **91**, 257-69.
- Mayer, A.** (2001). What drives membrane fusion in eukaryotes? *Trends Biochem Sci* **26**, 717-23.
- McMahon, H. T., Missler, M., Li, C. and Sudhof, T. C.** (1995). Complexins: cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function. *Cell* **83**, 111-9.
- Melloul, D., Marshak, S. and Cerasi, E.** (2002). Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia* **45**, 309-26.
- Meng, Y. X., Wilson, G. W., Avery, M. C., Varden, C. H. and Balczon, R.** (1997). Suppression of the expression of a pancreatic beta-cell form of the kinesin heavy chain by antisense oligonucleotides inhibits insulin secretion from primary cultures of mouse beta-cells. *Endocrinology* **138**, 1979-87.
- Merglen, A., Theander, S., Rubi, B., Chaffard, G., Wollheim, C. B. and Maechler, P.** (2004). Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. *Endocrinology* **145**, 667-78.



- Michael, D. J., Geng, X., Cawley, N. X., Loh, Y. P., Rhodes, C. J., Drain, P. and Chow, R. H.** (2004). Fluorescent cargo proteins in pancreatic beta-cells: design determines secretion kinetics at exocytosis. *Biophys J* **87**, L03-5.
- Michalak, M., Corbett, E. F., Mesaeli, N., Nakamura, K. and Opas, M.** (1999). Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J* **344 Pt 2**, 281-92.
- Micheva, K. D., Holz, R. W. and Smith, S. J.** (2001). Regulation of presynaptic phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate by neuronal activity. *J Cell Biol* **154**, 355-68.
- Milosevic, I., Sorensen, J. B., Lang, T., Krauss, M., Nagy, G., Haucke, V., Jahn, R. and Neher, E.** (2005). Plasmalemmal phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate level regulates the releasable vesicle pool size in chromaffin cells. *J Neurosci* **25**, 2557-65.
- Minami, K., Yano, H., Miki, T., Nagashima, K., Wang, C. Z., Tanaka, H., Miyazaki, J. I. and Seino, S.** (2000). Insulin secretion and differential gene expression in glucose-responsive and -unresponsive MIN6 sublines. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**, E773-81.
- Misura, K. M., Scheller, R. H. and Weis, W. I.** (2000). Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex. *Nature* **404**, 355-62.
- Mitchell, K. J., Lai, F. A. and Rutter, G. A.** (2003). Ryanodine receptor type I and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate receptors mediate  $Ca^{2+}$  release from insulin-containing vesicles in living pancreatic beta-cells (MIN6). *J Biol Chem* **278**, 11057-64.
- Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J. A., Ikura, M. and Tsien, R. Y.** (1997). Fluorescent indicators for  $Ca^{2+}$  based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**, 882-7.
- Molinete, M., Irminger, J. C., Tooze, S. A. and Halban, P. A.** (2000). Trafficking/sorting and granule biogenesis in the beta-cell. *Semin Cell Dev Biol* **11**, 243-51.
- Moller, D. E.** (2001). New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* **414**, 821-7.
- Monterrat, C., Boal, F., Grise, F., Hemar, A. and Lang, J.** (2006). Synaptotagmin 8 is expressed both as a calcium-insensitive soluble and membrane protein in neurons, neuroendocrine and endocrine cells. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 73-81.
- Morgan, A. and Burgoyne, R. D.** (2004). Membrane traffic: controlling membrane fusion by modifying NSF. *Curr Biol* **14**, R968-70.
- Morgan, A., Burgoyne, R. D., Barclay, J. W., Craig, T. J., Prescott, G. R., Ciuffo, L. F., Evans, G. J. and Graham, M. E.** (2005). Regulation of exocytosis by protein kinase C. *Biochem Soc Trans* **33**, 1341-4.
- Mousavi, S. A., Malerod, L., Berg, T. and Kjekken, R.** (2004). Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J* **377**, 1-16.

**Mundigl, O., Matteoli, M., Daniell, L., Thomas-Reetz, A., Metcalf, A., Jahn, R. and De Camilli, P.** (1993). Synaptic vesicle proteins and early endosomes in cultured hippocampal neurons: differential effects of Brefeldin A in axon and dendrites. *J Cell Biol* **122**, 1207-21.

**Murray, D. and Honig, B.** (2002). Electrostatic control of the membrane targeting of C2 domains. *Mol Cell* **9**, 145-54.

## N

**Nagy, G., Kim, J. H., Pang, Z. P., Matti, U., Rettig, J., Sudhof, T. C. and Sorensen, J. B.** (2006). Different effects on fast exocytosis induced by synaptotagmin 1 and 2 isoforms and abundance but not by phosphorylation. *J Neurosci* **26**, 632-43.

**Nagy, G., Reim, K., Matti, U., Brose, N., Binz, T., Rettig, J., Neher, E. and Sorensen, J. B.** (2004). Regulation of releasable vesicle pool sizes by protein kinase A-dependent phosphorylation of SNAP-25. *Neuron* **41**, 417-29.

**Nalefski, E. A., Wisner, M. A., Chen, J. Z., Sprang, S. R., Fukuda, M., Mikoshiba, K. and Falke, J. J.** (2001). C2 domains from different Ca<sup>2+</sup> signaling pathways display functional and mechanistic diversity. *Biochemistry* **40**, 3089-100.

**Neher, E.** (1998). Vesicle pools and Ca<sup>2+</sup> microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* **20**, 389-99.

**Nemoto, T., Kojima, T., Oshima, A., Bito, H. and Kasai, H.** (2004). Stabilization of exocytosis by dynamic F-actin coating of zymogen granules in pancreatic acini. *J Biol Chem* **279**, 37544-50.

**Nesher, R., Anteby, E., Yedovizky, M., Warwar, N., Kaiser, N. and Cerasi, E.** (2002). Beta-cell protein kinases and the dynamics of the insulin response to glucose. *Diabetes* **51 Suppl 1**, S68-73.

**Niemann, H., Blasi, J. and Jahn, R.** (1994). Clostridial neurotoxins: new tools for dissecting exocytosis. *Trends Cell Biol* **4**, 179-85.

**Nilsson, T., Arkhammar, P. and Berggren, P. O.** (1987). Extracellular Ca<sup>2+</sup> induces a rapid increase in cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> in pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* **149**, 152-8.

**Nishiki, T. and Augustine, G. J.** (2004a). Dual roles of the C2B domain of synaptotagmin I in synchronizing Ca<sup>2+</sup>-dependent neurotransmitter release. *J Neurosci* **24**, 8542-50.

**Nishiki, T. and Augustine, G. J.** (2004b). Synaptotagmin I synchronizes transmitter release in mouse hippocampal neurons. *J Neurosci* **24**, 6127-32.

- Nonet, M. L., Grundahl, K., Meyer, B. J. and Rand, J. B.** (1993). Synaptic function is impaired but not eliminated in *C. elegans* mutants lacking synaptotagmin. *Cell* **73**, 1291-305.
- Novick, P., Field, C. and Schekman, R.** (1980). Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* **21**, 205-15.
- Novick, P. and Schekman, R.** (1979). Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 1858-62.

## O

- O'Connor, V. M., Shamotienko, O., Grishin, E. and Betz, H.** (1993). On the structure of the 'synaptosecretosome'. Evidence for a neurexin/synaptotagmin/syntaxin/  $Ca^{2+}$  channel complex. *FEBS Lett* **326**, 255-60.
- Ohta, M., Nelson, J., Nelson, D., Meglasson, M. D. and Erecinska, M.** (1993). Effect of  $Ca^{2+}$  channel blockers on energy level and stimulated insulin secretion in isolated rat islets of Langerhans. *J Pharmacol Exp Ther* **264**, 35-40.
- Olofsson, C. S., Gopel, S. O., Barg, S., Galvanovskis, J., Ma, X., Salehi, A., Rorsman, P. and Eliasson, L.** (2002). Fast insulin secretion reflects exocytosis of docked granules in mouse pancreatic B-cells. *Pflugers Arch* **444**, 43-51.
- Olsen, H. L., Hoy, M., Zhang, W., Bertorello, A. M., Bokvist, K., Capito, K., Efanov, A. M., Meister, B., Thams, P., Yang, S. N. et al.** (2003). Phosphatidylinositol 4-kinase serves as a metabolic sensor and regulates priming of secretory granules in pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5187-92.
- Osborne, S. L., Herreros, J., Bastiaens, P. I. and Schiavo, G.** (1999). Calcium-dependent oligomerization of synaptotagmins I and II. Synaptotagmins I and II are localized on the same synaptic vesicle and heterodimerize in the presence of calcium. *J Biol Chem* **274**, 59-66.

## P

- Pang, Z. P., Sun, J., Rizo, J., Maximov, A. and Sudhof, T. C.** (2006). Genetic analysis of synaptotagmin 2 in spontaneous and  $Ca^{2+}$ -triggered neurotransmitter release. *Embo J* **25**, 2039-50.
- Perin, M. S., Brose, N., Jahn, R. and Sudhof, T. C.** (1991). Domain structure of synaptotagmin (p65). *J Biol Chem* **266**, 623-9.

- Perin, M. S., Fried, V. A., Mignery, G. A., Jahn, R. and Sudhof, T. C.** (1990). Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature* **345**, 260-3.
- Peters, C. and Mayer, A.** (1998).  $Ca^{2+}$ /calmodulin signals the completion of docking and triggers a late step of vacuole fusion. *Nature* **396**, 575-80.
- Poitout, V., Hagman, D., Stein, R., Artner, I., Robertson, R. P. and Harmon, J. S.** (2006). Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids. *J Nutr* **136**, 873-6.
- Poitout, V., Olson, L. K. and Robertson, R. P.** (1996). Insulin-secreting cell lines: classification, characteristics and potential applications. *Diabetes Metab* **22**, 7-14.
- Poskanzer, K. E., Fetter, R. D. and Davis, G. W.** (2006). Discrete residues in the C2B domain of synaptotagmin I independently specify endocytic rate and synaptic vesicle size. *Neuron* **50**, 49-62.
- Presley, J. F., Cole, N. B., Schroer, T. A., Hirschberg, K., Zaal, K. J. and Lippincott-Schwartz, J.** (1997). ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* **389**, 81-5.
- Proks, P., Eliasson, L., Ammala, C., Rorsman, P. and Ashcroft, F. M.** (1996).  $Ca^{2+}$ - and GTP-dependent exocytosis in mouse pancreatic beta-cells involves both common and distinct steps. *J Physiol* **496** ( Pt 1), 255-64.

## Q

- Quetglas, S., Iborra, C., Sasakawa, N., De Haro, L., Kumakura, K., Sato, K., Leveque, C. and Seagar, M.** (2002). Calmodulin and lipid binding to synaptobrevin regulates calcium-dependent exocytosis. *Embo J* **21**, 3970-9.

## R

- Rao, S. K., Huynh, C., Proux-Gillardeaux, V., Galli, T. and Andrews, N. W.** (2004). Identification of SNAREs involved in synaptotagmin VII-regulated lysosomal exocytosis. *J Biol Chem* **279**, 20471-9.
- Ravier, M. A., Guldenagel, M., Charollais, A., Gjinovci, A., Caille, D., Sohl, G., Wollheim, C. B., Willecke, K., Henquin, J. C. and Meda, P.** (2005). Loss of connexin36 channels alters beta-cell coupling, islet synchronization of glucose-induced  $Ca^{2+}$  and insulin oscillations, and basal insulin release. *Diabetes* **54**, 1798-807.
- Reddy, A., Caler, E. V. and Andrews, N. W.** (2001). Plasma membrane repair is mediated by  $Ca^{2+}$ -regulated exocytosis of lysosomes. *Cell* **106**, 157-69.

- Reetz, A., Solimena, M., Matteoli, M., Folli, F., Takei, K. and De Camilli, P.** (1991). GABA and pancreatic beta-cells: colocalization of glutamic acid decarboxylase (GAD) and GABA with synaptic-like microvesicles suggests their role in GABA storage and secretion. *Embo J* **10**, 1275-84.
- Regazzi, R., Li, G., Ullrich, S., Jaggi, C. and Wollheim, C. B.** (1989). Different requirements for protein kinase C activation and  $\text{Ca}^{2+}$ -independent insulin secretion in response to guanine nucleotides. Endogenously generated diacylglycerol requires elevated  $\text{Ca}^{2+}$  for kinase C insertion into membranes. *J Biol Chem* **264**, 9939-44.
- Regazzi, R., Wollheim, C. B., Lang, J., Theler, J. M., Rossetto, O., Montecucco, C., Sadoul, K., Weller, U., Palmer, M. and Thorens, B.** (1995). VAMP-2 and cellubrevin are expressed in pancreatic beta-cells and are essential for  $\text{Ca}^{2+}$ - but not for GTP gamma S-induced insulin secretion. *Embo J* **14**, 2723-30.
- Reist, N. E., Buchanan, J., Li, J., DiAntonio, A., Buxton, E. M. and Schwarz, T. L.** (1998). Morphologically docked synaptic vesicles are reduced in synaptotagmin mutants of *Drosophila*. *J Neurosci* **18**, 7662-73.
- Renstrom, E., Barg, S., Thevenod, F. and Rorsman, P.** (2002). Sulfonylurea-mediated stimulation of insulin exocytosis via an ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channel-independent action. *Diabetes* **51 Suppl 1**, S33-6.
- Rettig, J., Heinemann, C., Ashery, U., Sheng, Z. H., Yokoyama, C. T., Catterall, W. A. and Neher, E.** (1997). Alteration of  $\text{Ca}^{2+}$  dependence of neurotransmitter release by disruption of  $\text{Ca}^{2+}$  channel/syntaxin interaction. *J Neurosci* **17**, 6647-56.
- Rhee, J. S., Li, L. Y., Shin, O. H., Rah, J. C., Rizo, J., Sudhof, T. C. and Rosenmund, C.** (2005). Augmenting neurotransmitter release by enhancing the apparent  $\text{Ca}^{2+}$  affinity of synaptotagmin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18664-9.
- Rickman, C., Archer, D. A., Meunier, F. A., Craxton, M., Fukuda, M., Burgoyne, R. D. and Davletov, B.** (2004a). Synaptotagmin interaction with the syntaxin/SNAP-25 dimer is mediated by an evolutionarily conserved motif and is sensitive to inositol hexakisphosphate. *J Biol Chem* **279**, 12574-9.
- Rickman, C., Craxton, M., Osborne, S. and Davletov, B.** (2004b). Comparative analysis of tandem C2 domains from the mammalian synaptotagmin family. *Biochem J* **378**, 681-6.
- Rickman, C. and Davletov, B.** (2003). Mechanism of calcium-independent synaptotagmin binding to target SNAREs. *J Biol Chem* **278**, 5501-4.
- Rickman, C., Jimenez, J. L., Graham, M. E., Archer, D. A., Soloviev, M., Burgoyne, R. D. and Davletov, B.** (2006). Conserved prefusion protein assembly in regulated exocytosis. *Mol Biol Cell* **17**, 283-94.
- Rickman, C., Meunier, F. A., Binz, T. and Davletov, B.** (2004c). High affinity interaction of syntaxin and SNAP-25 on the plasma membrane is abolished by botulinum toxin E. *J Biol Chem* **279**, 644-51.

- Rizo, J., Chen, X. and Arac, D.** (2006). Unraveling the mechanisms of synaptotagmin and SNARE function in neurotransmitter release. *Trends Cell Biol* **16**, 339-50.
- Rizo, J. and Sudhof, T. C.** (1998). C2-domains, structure and function of a universal  $\text{Ca}^{2+}$ -binding domain. *J Biol Chem* **273**, 15879-82.
- Robinson, I. M., Ranjan, R. and Schwarz, T. L.** (2002). Synaptotagmins I and IV promote transmitter release independently of  $\text{Ca}^{2+}$  binding in the C2A domain. *Nature* **418**, 336-40.
- Rocheleau, J. V., Remedi, M. S., Granada, B., Head, W. S., Koster, J. C., Nichols, C. G. and Piston, D. W.** (2006). Critical role of gap junction coupled KATP channel activity for regulated insulin secretion. *PLoS Biol* **4**, e26.
- Roduit, R., Nolan, C., Alarcon, C., Moore, P., Barbeau, A., Delghingaro-Augusto, V., Przybykowski, E., Morin, J., Masse, F., Massie, B. et al.** (2004). A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli. *Diabetes* **53**, 1007-19.
- Roggero, C. M., Tomes, C. N., De Blas, G. A., Castillo, J., Michaut, M. A., Fukuda, M. and Mayorga, L. S.** (2005). Protein kinase C-mediated phosphorylation of the two polybasic regions of synaptotagmin VI regulates their function in acrosomal exocytosis. *Dev Biol* **285**, 422-35.
- Rorsman, P., Eliasson, L., Renstrom, E., Gromada, J., Barg, S. and Gopel, S.** (2000). The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion. *News Physiol Sci* **15**, 72-77.
- Rorsman, P. and Renstrom, E.** (2003). Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* **46**, 1029-45.
- Rufener, E., Frazier, A. A., Wieser, C. M., Hinderliter, A. and Cafiso, D. S.** (2005). Membrane-bound orientation and position of the synaptotagmin C2B domain determined by site-directed spin labeling. *Biochemistry* **44**, 18-28.

## S

- Sadoul, K., Berger, A., Niemann, H., Weller, U., Roche, P. A., Klip, A., Trimble, W. S., Regazzi, R., Catsicas, S. and Halban, P. A.** (1997). SNAP-23 is not cleaved by botulinum neurotoxin E and can replace SNAP-25 in the process of insulin secretion. *J Biol Chem* **272**, 33023-7.
- Sadoul, K., Lang, J., Montecucco, C., Weller, U., Regazzi, R., Catsicas, S., Wollheim, C. B. and Halban, P. A.** (1995). SNAP-25 is expressed in islets of Langerhans and is involved in insulin release. *J Cell Biol* **128**, 1019-28.
- Saegusa, C., Fukuda, M. and Mikoshiba, K.** (2002). Synaptotagmin V is targeted to dense-core vesicles that undergo calcium-dependent exocytosis in PC12 cells. *J Biol Chem* **277**, 24499-505.

- Sakaba, T., Stein, A., Jahn, R. and Neher, E.** (2005). Distinct kinetic changes in neurotransmitter release after SNARE protein cleavage. *Science* **309**, 491-4.
- Salton, S. R., Ferri, G. L., Hahm, S., Snyder, S. E., Wilson, A. J., Possenti, R. and Levi, A.** (2000). VGF: a novel role for this neuronal and neuroendocrine polypeptide in the regulation of energy balance. *Front Neuroendocrinol* **21**, 199-219.
- Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Polverino de Laureto, P., DasGupta, B. R. and Montecucco, C.** (1992). Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* **359**, 832-5.
- Schiavo, G., Gmachl, M. J., Stenbeck, G., Sollner, T. H. and Rothman, J. E.** (1995). A possible docking and fusion particle for synaptic transmission. *Nature* **378**, 733-6.
- Schiavo, G., Gu, Q. M., Prestwich, G. D., Sollner, T. H. and Rothman, J. E.** (1996). Calcium-dependent switching of the specificity of phosphoinositide binding to synaptotagmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13327-32.
- Schimmoller, F., Simon, I. and Pfeffer, S. R.** (1998). Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J Biol Chem* **273**, 22161-4.
- Schneggenburger, R. and Neher, E.** (2000). Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse. *Nature* **406**, 889-93.
- Schoch, S., Deak, F., Konigstorfer, A., Mozhayeva, M., Sara, Y., Sudhof, T. C. and Kavalali, E. T.** (2001). SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice. *Science* **294**, 1117-22.
- Schuit, F., Flamez, D., De Vos, A. and Pipeleers, D.** (2002). Glucose-regulated gene expression maintaining the glucose-responsive state of beta-cells. *Diabetes* **51 Suppl 3**, S326-32.
- Schulz, T. A. and Creutz, C. E.** (2004). The tricalbin C2 domains: lipid-binding properties of a novel, synaptotagmin-like yeast protein family. *Biochemistry* **43**, 3987-95.
- Seagar, M., Leveque, C., Charvin, N., Marqueze, B., Martin-Moutot, N., Boudier, J. A., Boudier, J. L., Shoji-Kasai, Y., Sato, K. and Takahashi, M.** (1999). Interactions between proteins implicated in exocytosis and voltage-gated calcium channels. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**, 289-97.
- Sekine, N., Cirulli, V., Regazzi, R., Brown, L. J., Gine, E., Tamarit-Rodriguez, J., Girotti, M., Marie, S., MacDonald, M. J., Wollheim, C. B. et al.** (1994). Low lactate dehydrogenase and high mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase in pancreatic beta-cells. Potential role in nutrient sensing. *J Biol Chem* **269**, 4895-902.
- Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N., Palmer, A. E. and Tsien, R. Y.** (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **22**, 1567-72.

- Shao, X., Fernandez, I., Sudhof, T. C. and Rizo, J.** (1998). Solution structures of the  $\text{Ca}^{2+}$ -free and  $\text{Ca}^{2+}$ -bound C2A domain of synaptotagmin I: does  $\text{Ca}^{2+}$  induce a conformational change? *Biochemistry* **37**, 16106-15.
- Shao, X., Li, C., Fernandez, I., Zhang, X., Sudhof, T. C. and Rizo, J.** (1997). Synaptotagmin-syntaxin interaction: the C2 domain as a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent electrostatic switch. *Neuron* **18**, 133-42.
- Sher, E., Giovannini, F., Codignola, A., Passafaro, M., Giorgi-Rossi, P., Volsen, S., Craig, P., Davalli, A. and Carrera, P.** (2003). Voltage-operated calcium channel heterogeneity in pancreatic beta cells: physiopathological implications. *J Bioenerg Biomembr* **35**, 687-96.
- Shi, Y., Kanaani, J., Menard-Rose, V., Ma, Y. H., Chang, P. Y., Hanahan, D., Tobin, A., Grodsky, G. and Baekkeskov, S.** (2000). Increased expression of GAD65 and GABA in pancreatic beta-cells impairs first-phase insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**, E684-94.
- Shin, O. H., Maximov, A., Lim, B. K., Rizo, J. and Sudhof, T. C.** (2004). Unexpected  $\text{Ca}^{2+}$ -binding properties of synaptotagmin 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2554-9.
- Shin, O. H., Rhee, J. S., Tang, J., Sugita, S., Rosenmund, C. and Sudhof, T. C.** (2003).  $\text{Sr}^{2+}$  binding to the  $\text{Ca}^{2+}$  binding site of the synaptotagmin 1 C2B domain triggers fast exocytosis without stimulating SNARE interactions. *Neuron* **37**, 99-108.
- Shoji-Kasai, Y., Yoshida, A., Sato, K., Hoshino, T., Ogura, A., Kondo, S., Fujimoto, Y., Kuwahara, R., Kato, R. and Takahashi, M.** (1992). Neurotransmitter release from synaptotagmin-deficient clonal variants of PC12 cells. *Science* **256**, 1821-3.
- Smith, C.** (1999). A persistent activity-dependent facilitation in chromaffin cells is caused by  $\text{Ca}^{2+}$  activation of protein kinase C. *J Neurosci* **19**, 589-98.
- Snyder, D. A., Kelly, M. L. and Woodbury, D. J.** (2006). SNARE complex regulation by phosphorylation. *Cell Biochem Biophys* **45**, 111-23.
- Snyder, S. E., Peng, B., Pintar, J. E. and Salton, S. R.** (2003). Expression of VGF mRNA in developing neuroendocrine and endocrine tissues. *J Endocrinol* **179**, 227-35.
- Sokac, A. M. and Bement, W. M.** (2006). Kiss-and-coat and compartment mixing: coupling exocytosis to signal generation and local actin assembly. *Mol Biol Cell* **17**, 1495-502.
- Spurlin, B. A. and Thurmond, D. C.** (2006). Syntaxin 4 facilitates biphasic glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic beta-cells. *Mol Endocrinol* **20**, 183-93.
- Sudhof, T. C.** (2002). Synaptotagmins: why so many? *J Biol Chem* **277**, 7629-32.
- Sudhof, T. C.** (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* **27**, 509-47.



- Sugita, S., Han, W., Butz, S., Liu, X., Fernandez-Chacon, R., Lao, Y. and Sudhof, T. C.** (2001). Synaptotagmin VII as a plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  sensor in exocytosis. *Neuron* **30**, 459-73.
- Sugita, S., Shin, O. H., Han, W., Lao, Y. and Sudhof, T. C.** (2002). Synaptotagmins form a hierarchy of exocytotic  $\text{Ca}^{2+}$  sensors with distinct  $\text{Ca}^{2+}$  affinities. *Embo J* **21**, 270-80.
- Sugita, S. and Sudhof, T. C.** (2000). Specificity of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protein interactions mediated by the C2A domains of synaptotagmins. *Biochemistry* **39**, 2940-9.
- Sutton, R. B., Davletov, B. A., Berghuis, A. M., Sudhof, T. C. and Sprang, S. R.** (1995). Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel  $\text{Ca}^{2+}$ /phospholipid-binding fold. *Cell* **80**, 929-38.
- Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R. and Brunger, A. T.** (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* **395**, 347-53.
- Szule, J. A. and Coorsen, J. R.** (2003). Revisiting the role of SNAREs in exocytosis and membrane fusion. *Biochim Biophys Acta* **1641**, 121-35.

## T

- Takei, K. and Haucke, V.** (2001). Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger. *Trends Cell Biol* **11**, 385-91.
- Thorens, B.** (2003a). A gene knockout approach in mice to identify glucose sensors controlling glucose homeostasis. *Pflugers Arch* **445**, 482-90.
- Thorens, B.** (2003b). Gluco-incretin hormones in insulin secretion and diabetes. *Med Sci (Paris)* **19**, 860-3.
- Thorens, B., Sarkar, H. K., Kaback, H. R. and Lodish, H. F.** (1988). Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. *Cell* **55**, 281-90.
- Tiedge, M. and Lenzen, S.** (1991). Regulation of glucokinase and GLUT-2 glucose-transporter gene expression in pancreatic B-cells. *Biochem J* **279** ( Pt 3), 899-901.
- Tsuboi, T. and Fukuda, M.** (2006). Rab3A and Rab27A cooperatively regulate the docking step of dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *J Cell Sci* **119**, 2196-203.
- Tsuboi, T., Ravier, M. A., Xie, H., Ewart, M. A., Gould, G. W., Baldwin, S. A. and Rutter, G. A.** (2005). Mammalian exocyst complex is required for the docking step of insulin vesicle exocytosis. *J Biol Chem* **280**, 25565-70.

**Tucker, W. C., Edwardson, J. M., Bai, J., Kim, H. J., Martin, T. F. and Chapman, E. R.** (2003). Identification of synaptotagmin effectors via acute inhibition of secretion from cracked PC12 cells. *J Cell Biol* **162**, 199-209.

**Tucker, W. C., Weber, T. and Chapman, E. R.** (2004). Reconstitution of  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated membrane fusion by synaptotagmin and SNAREs. *Science* **304**, 435-8.

## U

**Ubach, J., Lao, Y., Fernandez, I., Arac, D., Sudhof, T. C. and Rizo, J.** (2001). The C2B domain of synaptotagmin I is a  $\text{Ca}^{2+}$ -binding module. *Biochemistry* **40**, 5854-60.

**Ubach, J., Zhang, X., Shao, X., Sudhof, T. C. and Rizo, J.** (1998).  $\text{Ca}^{2+}$  binding to synaptotagmin: how many  $\text{Ca}^{2+}$  ions bind to the tip of a C2-domain? *Embo J* **17**, 3921-30.

**Ullrich, B. and Sudhof, T. C.** (1995). Differential distributions of novel synaptotagmins: comparison to synapsins. *Neuropharmacology* **34**, 1371-7.

**Ullrich, S. and Wollheim, C. B.** (1988). GTP-dependent inhibition of insulin secretion by epinephrine in permeabilized RINm5F cells. Lack of correlation between insulin secretion and cyclic AMP levels. *J Biol Chem* **263**, 8615-20.

## V

**Vaidyanathan, V. V., Yoshino, K., Jahnz, M., Dorries, C., Bade, S., Nauenburg, S., Niemann, H. and Binz, T.** (1999). Proteolysis of SNAP-25 isoforms by botulinum neurotoxin types A, C, and E: domains and amino acid residues controlling the formation of enzyme-substrate complexes and cleavage. *J Neurochem* **72**, 327-37.

**Vangheluwe, P., Raeymaekers, L., Dode, L. and Wuytack, F.** (2005). Modulating sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase 2 (SERCA2) activity: cell biological implications. *Cell Calcium* **38**, 291-302.

**Velloso, L. A., Carneiro, E. M., Crepaldi, S. C., Boschero, A. C. and Saad, M. J.** (1995). Glucose- and insulin-induced phosphorylation of the insulin receptor and its primary substrates IRS-1 and IRS-2 in rat pancreatic islets. *FEBS Lett* **377**, 353-7.

**Verhage, M., Maia, A. S., Plomp, J. J., Brussaard, A. B., Heeroma, J. H., Vermeer, H., Toonen, R. F., Hammer, R. E., van den Berg, T. K., Missler, M. et al.** (2000). Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* **287**, 864-9.

**Vician, L., Lim, I. K., Ferguson, G., Tocco, G., Baudry, M. and Herschman, H. R.** (1995). Synaptotagmin IV is an immediate early gene induced by depolarization in PC12 cells and in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 2164-8.

- Virmani, T., Han, W., Liu, X., Südhof, T. C. and Kavalali, E. T. (2003a).** Synaptotagmin 7 splice variants differentially regulate synaptic vesicle recycling. *Embo J* **22**, 5347-57.
- Virmani, T., Han, W., Liu, X., Südhof, T. C. and Kavalali, E. T. (2003b).** Synaptotagmin 7 splice variants differentially regulate synaptic vesicle recycling. *EMBO J.* **22**, 5347-5357.
- Vo, Y. P., Hutton, J. C. and Angleson, J. K. (2004).** Recycling of the dense-core vesicle membrane protein phogrin in Min6 beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* **324**, 1004-10.
- Voets, T., Moser, T., Lund, P. E., Chow, R. H., Geppert, M., Südhof, T. C. and Neher, E. (2001).** Intracellular calcium dependence of large dense-core vesicle exocytosis in the absence of synaptotagmin I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11680-5.
- von Poser, C., Ichtchenko, K., Shao, X., Rizo, J. and Südhof, T. C. (1997).** The evolutionary pressure to inactivate. A subclass of synaptotagmins with an amino acid substitution that abolishes  $Ca^{2+}$  binding. *J Biol Chem* **272**, 14314-9.
- von Poser, C., Zhang, J. Z., Mineo, C., Ding, W., Ying, Y., Südhof, T. C. and Anderson, R. G. (2000).** Synaptotagmin regulation of coated pit assembly. *J Biol Chem* **275**, 30916-24.

## W

- Walch-Solimena, C., Takei, K., Marek, K. L., Midyett, K., Südhof, T. C., De Camilli, P. and Jahn, R. (1993).** Synaptotagmin: a membrane constituent of neuropeptide-containing large dense-core vesicles. *J Neurosci* **13**, 3895-903.
- Wan, Q. F., Dong, Y., Yang, H., Lou, X., Ding, J. and Xu, T. (2004).** Protein kinase activation increases insulin secretion by sensitizing the secretory machinery to  $Ca^{2+}$ . *J Gen Physiol* **124**, 653-62.
- Wang, C. T., Bai, J., Chang, P. Y., Chapman, E. R. and Jackson, M. B. (2006).** Synaptotagmin-  $Ca^{2+}$  triggers two sequential steps in regulated exocytosis in rat PC12 cells: fusion pore opening and fusion pore dilation. *J Physiol* **570**, 295-307.
- Wang, C. T., Grishanin, R., Earles, C. A., Chang, P. Y., Martin, T. F., Chapman, E. R. and Jackson, M. B. (2001).** Synaptotagmin modulation of fusion pore kinetics in regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Science* **294**, 1111-5.
- Wang, C. T., Lu, J. C., Bai, J., Chang, P. Y., Martin, T. F., Chapman, E. R. and Jackson, M. B. (2003a).** Different domains of synaptotagmin control the choice between kiss-and-run and full fusion. *Nature* **424**, 943-7.

- Wang, P., Chicka, M. C., Bhalla, A., Richards, D. A. and Chapman, E. R.** (2005). Synaptotagmin VII is targeted to secretory organelles in PC12 cells, where it functions as a high-affinity calcium sensor. *Mol Cell Biol* **25**, 8693-702.
- Wang, P., Wang, C. T., Bai, J., Jackson, M. B. and Chapman, E. R.** (2003b). Mutations in the effector binding loops in the C2A and C2B domains of synaptotagmin I disrupt exocytosis in a nonadditive manner. *J Biol Chem* **278**, 47030-7.
- Warwar, N., Efendic, S., Ostenson, C. G., Haber, E. P., Cerasi, E. and Nesher, R.** (2006). Dynamics of glucose-induced localization of PKC isoenzymes in pancreatic beta-cells: diabetes-related changes in the GK rat. *Diabetes* **55**, 590-9.
- 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 al.** (2002). Genetic ablation of the t-SNARE SNAP-25 distinguishes mechanisms of neuroexocytosis. *Nat Neurosci* **5**, 19-26.
- Waters, M. G. and Hughson, F. M.** (2000). Membrane tethering and fusion in the secretory and endocytic pathways. *Traffic* **1**, 588-97.
- Weber, T., Zemelman, B. V., McNew, J. A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Sollner, T. H. and Rothman, J. E.** (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* **92**, 759-72.
- Welsh, N., Sandler, S., Welsh, M. and Hellerstrom, C.** (1986). Regulation of RNA metabolism in relation to insulin production and oxidative metabolism in mouse pancreatic islets in vitro. *Biochim Biophys Acta* **887**, 58-68.
- Wenk, M. R. and De Camilli, P.** (2004). Protein-lipid interactions and phosphoinositide metabolism in membrane traffic: insights from vesicle recycling in nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8262-9.
- 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**, 10983-9.
- Willig, K. I., Rizzoli, S. O., Westphal, V., Jahn, R. and Hell, S. W.** (2006). STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis. *Nature* **440**, 935-9.
- Wiser, O., Trus, M., Hernandez, A., Renstrom, E., Barg, S., Rorsman, P. and Atlas, D.** (1999). The voltage sensitive Lc-type Ca<sup>2+</sup> channel is functionally coupled to the exocytotic machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 248-53.
- Wollheim, C. B., Blondel, B., Trueheart, P. A., Renold, A. E. and Sharp, G. W.** (1975). Calcium-induced insulin release in monolayer culture of the endocrine pancreas. Studies with ionophore A23187. *J Biol Chem* **250**, 1354-60.

**Wu, Y., He, Y., Bai, J., Ji, S. R., Tucker, W. C., Chapman, E. R. and Sui, S. F.** (2003). Visualization of synaptotagmin I oligomers assembled onto lipid monolayers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2082-7.

## X

**Xiong, X., Zhou, K. M., Wu, Z. X. and Xu, T.** (2006). Silence of synaptotagmin I in INS-1 cells inhibits fast exocytosis and fast endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* **347**, 76-82.

**Xu, B. E., Lee, B. H., Min, X., Lenertz, L., Heise, C. J., Stippec, S., Goldsmith, E. J. and Cobb, M. H.** (2005). WNK1: analysis of protein kinase structure, downstream targets, and potential roles in hypertension. *Cell Res* **15**, 6-10.

**Xu, G. G., Gao, Z. Y., Borge, P. D., Jr., Jegier, P. A., Young, R. A. and Wolf, B. A.** (2000). Insulin regulation of beta-cell function involves a feedback loop on SERCA gene expression, Ca<sup>2+</sup> homeostasis, and insulin expression and secretion. *Biochemistry* **39**, 14912-9.

## Y

**Yamada, W. M. and Zucker, R. S.** (1992). Time course of transmitter release calculated from simulations of a calcium diffusion model. *Biophys J* **61**, 671-82.

**Yang, Y. and Gillis, K. D.** (2004). A highly Ca<sup>2+</sup>-sensitive pool of granules is regulated by glucose and protein kinases in insulin-secreting INS-1 cells. *J Gen Physiol* **124**, 641-51.

**Yang, Y., Udayasankar, S., Dunning, J., Chen, P. and Gillis, K. D.** (2002). A highly Ca<sup>2+</sup>-sensitive pool of vesicles is regulated by protein kinase C in adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 17060-5.

**Yap, K. L., Ames, J. B., Swindells, M. B. and Ikura, M.** (1999). Diversity of conformational states and changes within the EF-hand protein superfamily. *Proteins* **37**, 499-507.

**Yoshihara, M., Adolfsen, B., Galle, K. T. and Littleton, J. T.** (2005). Retrograde signaling by Syt 4 induces presynaptic release and synapse-specific growth. *Science* **310**, 858-63.

**Yoshihara, M. and Montana, E. S.** (2004). The synaptotagmins: calcium sensors for vesicular trafficking. *Neuroscientist* **10**, 566-74.

## Z

- Zhang, H., Kelley, W. L., Chamberlain, L. H., Burgoyne, R. D. and Lang, J.** (1999). Mutational analysis of cysteine-string protein function in insulin exocytosis. *J Cell Sci* **112** ( Pt 9), 1345-51.
- Zhang, H., Kelley, W. L., Chamberlain, L. H., Burgoyne, R. D., Wollheim, C. B. and Lang, J.** (1998a). Cysteine-string proteins regulate exocytosis of insulin independent from transmembrane ion fluxes. *FEBS Lett* **437**, 267-72.
- Zhang, J., Lu, W., Li, Y., Wu, J. and Zhang, C.** (2005a). Anti-sense RNA inhibits the expression of synaptotagmin II in RBL-2H3 and enhances the exocytosis of lysosomes in RBL-2H3. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* **25**, 117-20.
- Zhang, J., Wu, J., Pan, S. and Lv, W.** (2005b). The distribution of synaptotagmin II in RBL-2H3 and its regulation on exocytosis of lysosomes in RBL-2H3. *Cell Mol Immunol* **2**, 205-9.
- Zhang, J. Z., Davletov, B. A., Sudhof, T. C. and Anderson, R. G.** (1994). Synaptotagmin I is a high affinity receptor for clathrin AP-2: implications for membrane recycling. *Cell* **78**, 751-60.
- Zhang, X., Kim-Miller, M. J., Fukuda, M., Kowalchyk, J. A. and Martin, T. F.** (2002).  $Ca^{2+}$ -dependent synaptotagmin binding to SNAP-25 is essential for  $Ca^{2+}$ -triggered exocytosis. *Neuron* **34**, 599-611.
- Zhang, X., Rizo, J. and Sudhof, T. C.** (1998b). Mechanism of phospholipid binding by the C2A-domain of synaptotagmin I. *Biochemistry* **37**, 12395-403.
- Zimmerberg, J., Akimov, S. A. and Frolov, V.** (2006). Synaptotagmin: fusogenic role for calcium sensor? *Nat Struct Mol Biol* **13**, 301-3.
- Zimmet, P., Alberti, K. G. and Shaw, J.** (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* **414**, 782-7.
- Zinsmaier, K. E. and Bronk, P.** (2001). Molecular chaperones and the regulation of neurotransmitter exocytosis. *Biochem Pharmacol* **62**, 1-11.

## RESUME

Les synaptotagmines (Syt) sont des protéines comportant deux domaines C<sub>2</sub> capables de lier les phospholipides et les protéines de la machinerie de fusion membranaire de façon dépendante du calcium. Plusieurs de ces protéines régulent l'exocytose des vésicules de sécrétion dans les cellules sécrétoires. Dans les cellules β-pancréatiques, les Syts impliquées dans la libération d'insuline ne sont pas connues. Trois isoformes pourraient tenir cette fonction, Syt7, Syt8 et Syt9. Nous avons déterminé la localisation sub-cellulaire de l'isoforme Syt7 au niveau des endosomes/lysosomes et de Syt8 au niveau de l'appareil de Golgi dans les cellules endocrines, neuroendocrines et les neurones. Ces deux protéines ne semblent donc pas intervenir dans l'exocytose de l'insuline. Par contre, la protéine Syt9 est localisée sur les granules de sécrétion dans les cellules β et est impliquée dans l'exocytose Ca<sup>2+</sup>-dépendante d'un pool de vésicules. Cependant, Syt9 se comporte différemment des Syt classiques (Syt1/2). Nous avons donc caractérisé la dépendance calcique des liaisons aux membranes *in vitro* et *in vivo* des domaines C<sub>2</sub> de Syt9 pour déterminer son implication dans la sécrétion d'insuline. Nous avons ainsi montré que le domaine C<sub>2</sub>B ne se liait pas aux phospholipides membranaires. Par mutagenèse dirigée, nous avons aussi démontré la nécessité du domaine C<sub>2</sub>A dans la liaison à la membrane plasmique et le rôle du domaine C<sub>2</sub>B dans la localisation de Syt9 au niveau des endosomes. De plus, nous avons montré que l'inhibition de l'expression de Syt9 affecte le trafic vésiculaire. Ces résultats suggèrent que Syt9 intervient lors des phases précoces de l'exocytose et lors du recyclage.

Mots-clés: Cellules β-pancréatiques, Exocytose, Insuline, Calcium, Synaptotagmines.

## SUMMARY

Synaptotagmins (Syt) are proteins containing two C<sub>2</sub> domains which bind phospholipids and proteins involved in membrane fusion in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. Several of these proteins regulate exocytosis in secretory cells. In pancreatic β-cells, the precise nature of syts implicated in insulin release are not known. Three isoforms could assume this function: Syt7, Syt8 and Syt9. To clarify this important point, we determined their subcellular localisation and Ca<sup>2+</sup>-dependant behaviour. According to our results, splice variants of Syt7 are present on endosomes, lysosomes and plasma membrane whereas Syt8 was found on the Golgi apparatus in endocrine, neuroendocrines cells, and in neurons. Moreover, syt8 did not translocate in response to Ca<sup>2+</sup>. Thus these two proteins do not intervene in the exocytosis of insulin. In contrast, Syt9 was localised on secretory granules in β-cells and is implicated in Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis of a distinct pool of vesicles as revealed by specific knock-down. Surprisingly, syt9 behaved differently from Syts (Syt1/2) despite a high degree of homology. We therefore characterized more in detail the calcium dependency of membrane interactions of Syt9C<sub>2</sub> domains *in vitro* and *in vivo*. Using truncated and point mutated fluorescent constructs we found that the C<sub>2</sub>A domain is essential for binding with the plasma membrane phospholipids whereas C<sub>2</sub>B domain did not bind to membranes. Interestingly, the C<sub>2</sub>B domain was implicated in localization of Syt9 on the endosomes subsequent to stimulation. These results suggest that Syt9 intervenes in early, glucose-dependent, phases of exocytosis and eventually during recycling.

Keywords: Pancreatic β-cells, Exocytosis, Insulin, Calcium, Synaptotagmin