

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I

École Doctorale des Sciences de la Vie, Géosciences et Sciences de
L'Environnement

par Carole MONTERRAT

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : SCIENCES DES ALIMENTS ET NUTRITION

**LES SYNAPTOTAGMINES ET LE TRANSPORT VÉSICULAIRE
DANS LES CELLULES β PANCRÉATIQUES :
UNE ISOFORME POUR CHAQUE ÉTAPE ?**

Soutenue le 10 Décembre 2004

Après avis de Messieurs :

Dominique BATAILLE, Directeur de Recherche INSERM U376, Montpellier
Michael SEAGAR, Directeur de Recherche INSERM UMR641, Marseille

Devant la commission d'examen formée de Messieurs:

Paul HIGUERET, Professeur Université Bordeaux 1
Dominique BATAILLE, Directeur de Recherche INSERM U376, Montpellier
Michael SEAGAR, Directeur de Recherche INSERM UMR641, Marseille
Marc LANDRY, Professeur Université Bordeaux 2
Jochen LANG, Professeur Université Bordeaux 1

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 Biologie de Bordeaux.

Je voudrais remercier Jochen Lang, le courageux directeur qui a pris le risque de prendre une "vieille" thésarde, grâce à lui j'ai pu réaliser cette thèse.

Je remercie messieurs D. Bataille et M. Seagar d'avoir accepté de juger mon travail et messieurs P.Higueret et M.Landry d'avoir fait partie de mon jury.

Ce travail n'aurait pas été réalisable sans l'aide de Marie Noëlle Benassy et Alexandra Milochau, je les remercie beaucoup pour l'aide précieuse qu'elles m'ont apportée.

Pendant ces quatre années, j'ai bien entendu noué des relations de travail enrichissantes, elles se sont doublées de relations amicales.

Je suis ravie de retrouver Sophie dans mes nouvelles fonctions, en espérant que nous ayons autant de fous rires que lorsque nous avons nettoyé les étagères des placards... Je pense que nous allons avoir du pain sur la planche, ou du beurre sur la tranche, peut être du beurre sur la planche ???

Je pense que le flambeau du thésard-Conchita/Conchito a été magnifiquement repris par Fred et Florence. Bravo ! Nous pouvons partir tranquilles. Florence est aussi devenue madame Synaptotagmine 9, je te souhaite beaucoup de bonheur avec cette merveilleuse protéine. Merci à Fred qui m'a bien aidée au moment où le sujet en avait besoin mais surtout pour les franches rigolades (du pain sur la planche, ou du beurre sur la tranche, peut être du beurre sur la planche ???).

Bien sur il y a aussi Valérie qui a toujours su me remonter le moral quand il le fallait, tes conseils toujours justes m'ont fait avancer, merci beaucoup. Je reviendrai sans doute te demander encore et encore et encore...

Merci aussi à Mathilde, incroyablement constante dans sa bonne humeur. Comment fais-tu pour manger un clown tous les matins ? Il faudra que tu me donnes ton fournisseur.

Bien entendu il y a eu Céline et Béatrice. Comment vous dire merci en deux phrases ? Je crois simplement que l'année 2004 n'aurait pas été vivable sans vous. Je sais que vous avez vécu tout ça avec moi, vous devriez avoir votre nom sur la première page...

Merci à Philippe pour son soutien infailible, à n'importe quelle heure du jour et de la nuit. Vraiment la meilleure hot-line que je connaisse (quand il n'est pas sorti manger du pain) !

A mes parents qui ont toujours soutenu mes choix, études-travail-études. Combien de fois vous ai-je dit que c'était la dernière année ? C'est promis cette fois-ci c'est la dernière...je crois !

INTRODUCTION	11
I / LES MÉCANISMES CELLULAIRES DE LA SÉCRÉTION D'INSULINE	12
A / L'homéostasie du glucose	12
B / Le pancréas	14
C / De l'augmentation de la glycémie à la sécrétion d'insuline	16
1 – Le métabolisme du glucose dans les cellules β	16
2 – La cellule β : une cellule spécialisée	17
D / Les systèmes d'amplification de la sécrétion d'insuline	18
1 – Les incréтины	18
2 – L'acétylcholine	20
3 – Les régulations autocrines et paracrines de la sécrétion d'insuline	21
4 – Les sulfonylurées	22
E / La sécrétion pancréatique d'insuline	22
1 – Le synchronisme au sein d'un îlot	22
2 – La sécrétion pancréatique d'insuline, mesurée en fonction du temps, est biphasique	24
3 – Les facteurs de régulation de la sécrétion indépendante des canaux K^+ dépendants de l'ATP	28
F / Le diabète de type 2	29
II / LES MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DE L'EXOCYTOSE	31
A / La biosynthèse de l'insuline	31
1 – Transcription du gène et traduction de la préproinsuline	31
2 – Maturation de la protéine et formation des vésicules sécrétoires	31
B / Les vésicules sécrétoires	35
1 – Les différents types de vésicules dans les cellules β	35
1.1 – Les microvésicules de type synaptiques ou MVTS (Synaptic Like MicroVesicles)	35
1.2 – Les granules sécrétoires ou vésicules larges à cœur dense (VLCD)	35
2 – Les étapes vers la fusion	36
2.1 – “Docking” ou amarrage	36
2.2 – “Tethering” ou accrochage	38
2.3 – “Priming”	38
3 – La fusion de la vésicule avec la membrane plasmique	39
3.1 – Fusion complète ou incomplète (“kiss-and-run”)	39
3.2 – Le pore de fusion : lipidique ou protéique ?	40
C / Les acteurs moléculaires de la fusion membranaire	41
1 – Le complexe SNARE	41
1.1 – Mise en évidence du complexe de fusion universel	41
1.2 – Description du complexe SNARE	43
1.3 – Les protéines SNARE et les cellules β pancréatiques	43
1.4 – Les protéines SNARE et la fusion membranaire	45
2 – Les régulateurs de l'association du complexe SNARE	47
2.1 – La complexine	48
2.2 – Munc-18	48
2.3 – Les protéines Rab	48
3 – Le calcium : facteur déclencheur de la stimulation	50
4 – Les senseurs calciques	52

III / LES SYNAPTOTAGMINES	54
A / Structure de Syt 1	54
1 – Les différents domaines de Syt 1	55
2 – Les domaines C2	57
B / Les interactions fonctionnelles de Syt 1	57
1 – La liaison de Syt 1 aux phospholipides anioniques	57
1.1 – La liaison aux phospholipides dépendante du calcium	57
1.2 – Mécanisme de liaison du calcium sur les boucles des domaines C2	59
1.3 – Liaison aux phospholipides par les résidus hydrophobes	61
1.4 – La liaison aux phospholipides indépendante du calcium	61
2 – La liaison de Syt 1 aux protéines du complexe SNARE	63
2.1 – Liaison de Syt 1 à la syntaxine 1	65
2.2 – Liaison de Syt 1 à SNAP-25	65
2.3 – Liaison de Syt 1 à VAMP-2	66
2.4 – Modèles d’interaction entre Syt 1 et le complexe SNARE	66
3 – Liaison de Syt 1 aux canaux calciques dépendants du voltage	67
3.1 – L’interaction entre les canaux calciques et Syt 1	67
3.2 – Rôle physiologique de l’interaction entre canaux calciques et Syt 1	68
4 – La liaison à la neurexine et à la calmoduline	69
5 – Le domaine C2B de Syt 1 : domaine de liaison spécifique ?	70
5.1 – Liaison à l’adaptine AP-2	70
5.2 – Liaison à β -SNAP	70
5.3 – L’oligomérisation dépendante du calcium	70
C / Syt 1 : Senseur calcique de la transmission synaptique	72
1 – Les études génétiques et le rôle Syt 1 dans la transmission synaptique synchrone	72
2 – Les études fonctionnelles cellulaires et le rôle de Syt 1 dans l’exocytose	73
3 – Les études biochimiques établissant Syt 1 comme senseur calcique de l’exocytose	74
D / Les Synaptotagmines : une grande famille de protéines	77
1 – La famille des Synaptotagmines	77
1.1 – Analyse génétique de la famille	77
1.2 – Classification des différentes isoformes	78
2 – Les caractéristiques biochimiques des différentes isoformes de la synaptotagmine	79
2.1 – Syt 1, Syt 2 et Syt 9	79
2.2 – Syt 3, Syt 5, Syt 6 et Syt 10	81
2.3 – Syt 4 et Syt 11	81
2.4 – Syt 7	81
2.5 – Syt 8 et Syt 12 à Syt 16	82
3 – Distribution tissulaire, localisation et fonction connues des isoformes de la synaptotagmine	82
3.1 – Syt 1, Syt 2 et Syt 9	82
3.2 – Syt 3, Syt 5, Syt 6 et Syt 10	84
3.3 – Syt 4 et Syt 11	84
3.4 – Syt 7	85
3.5 – Syt 8 et Syt 12 à Syt 16	85
OBJECTIFS DE L’ÉTUDE	87

***QUELLE ISOFORME JOUE LE ROLE DE SENSEUR CALCIQUE DE
L'EXOCYTOSE DES CELLULES INSULINO-SÉCRÉTOIRES : SYT 7 OU SYT 9?91***

I / INTRODUCTION	92
II / RÉSULTATS	94
A / Syt 7 et Syt 9 : deux protéines ubiquitaires _____	94
1 – Distribution cellulaire et tissulaire de Syt 7	94
2 – Distribution cellulaire et tissulaire de Syt 9	95
B / Localisation subcellulaire des isoformes Syt 7 et Syt 9 dans les cellules neuroendocrines ____	96
1 – Syt 9, mais pas Syt 7, est présente sur les VLCD des cellules insulino-sécrétoires et des cellules chromaffines	96
2 – Syt 7 est localisée sur les lysosomes des cellules PC12 et des neurones embryonnaires d'hippocampe en culture	101
C / Etude de la fonction de Syt 9 dans les HIT-T15 : sécrétion stimulée d'insuline _____	106
III / DISCUSSION	109

***SYT 8 EST EXPRIMÉE SOUS UNE FORME SOLUBLE DANS LES CELLULES
ENDOCRINES*..... 113**

INTRODUCTION À L'ARTICLE	114
I / INTRODUCTION	117
II / MATERIALS AND METHODS	118
III / RESULTS AND DISCUSSION	121
CONCLUSIONS DE L'ARTICLE	130

***EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE DE SYT 10, SYT 11 ET SYT 13 DANS LES
CELLULES NEUROENDOCRINES*..... 131**

I / INTRODUCTION	132
II / RÉSULTATS	134
A / production et caractérisation des anticorps polyclonaux _____	134
1 – Production et purification des anticorps	134
2 – Test de spécificité des anticorps polyclonaux	134
B / Syt 10, Syt 11 et Syt 13 ne sont pas des protéines ubiquitaires _____	136
1 – Syt 10 n'est pas exprimée dans les cellules clonales mais dans les cellules primaires endocrines	136
2 – Syt 11 et Syt 13 sont exprimées dans les cellules insulino-sécrétoires et le cerveau	138
C / Localisation subcellulaire de Syt 11 et Syt 13 par fractionnement des cellules MIN6 sur un gradient continu de saccharose _____	140

D / Localisation subcellulaire de Syt 11 dans les cellules MIN6	140
1 – Syt 11 n'est pas localisée sur les vésicules sécrétoires dans les cellules MIN6 et PC12	142
2 – Syt 11 est partiellement colocalisée avec ERGIC-53 et β -COP	142
III / DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	146
 CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	 149
 MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	 159
I / MATERIEL.....	160
A / Lignées cellulaires	160
B / Bactéries	160
C / Animaux	160
D / Anticorps	161
II / METHODES	162
A / Clonage des séquences codantes des Syt et mutagenèse dirigée	163
1 – Préparation des ARN totaux.....	163
2 – Transcription inverse.....	163
3 – Amplification des séquences spécifiques	165
4 – Séparation des fragments d'ADN sur gel d'agarose	165
5 – Ligature des fragments d'ADN.....	165
6 – Préparation des bactéries compétentes.....	166
7 – Transformation des bactéries	166
8 – Purification de l'ADN à partir de cultures bactériennes.....	166
9 – Séquençage.....	167
10 – Construction des plasmides pGEX2T-Syt et pCMVtag2-Syt 9	167
11 – Mutagenèse dirigée	167
B / Production et purification des protéines recombinantes	168
1 – Production des protéines recombinantes	169
2 – Extraction et purification des protéines recombinantes.....	169
C / Production des anticorps polyclonaux	169
1 – Production des sérums.....	170
2 – Immunopurification.....	170
D / Culture cellulaire	173
E / Préparation des extraits cellulaires et tissulaires	173
1 – Préparation des surnageants post-nucléaires	173
2 – Préparation des fractions cytosoliques et membranaires des synaptosomes	174

F / Séparation des organelles par vitesse de sédimentation sur gradient continu de saccharose	174
1 – Constitution des gradients continus.....	174
2 – Préparation des extraits de MIN6 en vue de la séparation sur gradient continu de saccharose	175
3 – Caractérisation du gradient.....	175
G / Immunodétection (Western Blot)	176
1 – Séparation des protéines par électrophorèse en condition dénaturante	176
2 – Immunodétection.....	176
H / Immunofluorescence	176
1 – Isolement des cellules primaires pour l’immunofluorescence.....	176
1.1 – Préparation des îlots de Langerhans de souris	176
1.2 – Neurones d’hippocampe de rat embryonnaire au stade E18.....	177
1.3 – Préparation des cellules chromaffines	178
2 – Ensemencement des cellules clonales pour l’immunofluorescence	178
3 – Immunofluorescence	178
I / Sécrétion stimulée d’hormone de croissance	179
1 – Transfection transitoire	179
2 – Incubation statique	179
ANNEXE 1 : COMPOSITION DES SOLUTIONS.....	181
ANNEXE 2 : SCHÉMATISATION DE LA SÉQUENCE DES PLASMIDES CONSTRUITS	183
ANNEXE 3 : PROTOCOLE D’IMMUNISATION DES LAPINS POUR LA PRODUCTION DES ANTICORPS POLYCLONAUX : EXEMPLE POUR SYT 8.....	186
<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	<i>159</i>

AC : adénylate cyclase

ACh : acétylcholine

AMPC : adénosine monophosphate cyclique

ADP : adénoside diphosphate

ATP : adénoside triphosphate

BAPTA : 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N'-tetraacetic acid

[Ca²⁺]_i : concentration intracellulaire en calcium libre

CRE : calcium response element

CREB : CAMP response element binding protein

CR : compartiment de réserve

CRL : compartiment de vésicules rapidement libérables

CSP : cystein string protein

DAG : diacylglycérol

DTM : domaine transmembranaire

DT2 : diabète de type 2

EGTA : acide éthylène glycol-bis(β-aminoéthyléther) N, N, N', N'-tétraacétique

ERGIC : endoplasmic reticulum golgi intermediate compartment

fF : fFarad

FRET : fluorescence resonance energy transfert

GABA : γ amino butiric acid

GDI : guanine dissociation inhibitor

GDP : guanoside triphosphate

GEF : guanine nucleotide exchange factor

GIP : glucose-dependant insulintropic peptide

GK : glukokinase

GLP-1 : glucagon-like peptide-1

GLUT : transporteur du glucose

GPDHm : glycérol phosphate déshydrogénase mitochondriale

GST : glutathione-S-transférase

GTP : guanoside triphosphate

hGH : hormone de croissance humaine

IP₃ : inositol-3-phosphate

IP₄ : inositol 4 phosphate
IRS-1/2 : insulin receptor substrate 1/2
K_{ATP} : canaux potassiques dépendants de l'ATP
LDH : lactate déshydrogénase
NEM : N-ethylmaleimide
NGF : nerve growth factor
NSF : N-ethylmaleimide sensitive fusion protein
PC : pyruvate carboxylase
PC 1/2 : prohormone convertase 1/2
PDH : pyruvate déshydrogénase
PDX-1 : pancreatic duodenal homeobox 1
PI : proinsuline
PI3-kinase : phosphoinositol-3-kinase
PIP₂ : phosphoinositol (4,5) diphosphate
PKA : protéine kinase A
PKC : protéine kinase C
PLC : phospholipase C
PPI : pré-pro-insuline
PS : phosphatidyl sérine
RBL : rat basophilic leukaemia
RTfn : récepteur à la transferrine
MVTS : microvesicule de type synaptique
SNAP : SNARE-associated protein
SNAP-23/25 : soluble NSF attachment protein 23/25
SNARE : soluble NSF attachment protein receptor
Syt : synaptotagmine
TDI : inhibition dépendante du temps
TDP : time dependant potentialisation
VAMP : vesicule associated membran protein
VLCD : vésicules larges à cœur dense

Figure I1 :	Coupe histologique de pancréas humain.....	8
Figure I2 :	De l'augmentation de la glycémie à la sécrétion d'insuline	10
Figure I3 :	Les systèmes d'amplification de la sécrétion d'insuline	14
Figure I4 :	Le synchronisme au sein de l'îlot	18
Figure I5 :	La sécrétion pancréatique d'insuline en fonction du temps est biphasique.....	20
Figure I6 :	La première phase de la sécrétion d'insuline est assurée par l'exocytose du compartiment rapidement libérable (CRL)	22
Figure I7:	Modélisation de la sécrétion biphasique d'insuline	22
Figure I8 :	La biosynthèse et le transport des vésicules sécrétoires dans la cellule β pancréatique.....	26
Figure I9 :	Les étapes vers la fusion	31
Figure I10 :	Topologie et organisation du complexe SNARE.....	36
Figure I11 :	Le complexe SNARE	38
Figure I12 :	Le cycle conformationnel des protéines SNARE.....	40
Figure I13 :	Les régulateurs de l'association du complexe SNARE : le cycle des protéines Rab.....	43
Figure I14 :	Structure de la synaptotagmine 1.....	49
Figure I15 :	La liaison des ions calcium sur les domaines C2 : un modèle.....	52
Figure I16 :	Mécanisme de liaison des ions calcium sur les boucles des domaines C2	54
Figure I17 :	Mode d'insertion de la Syt 1 dans la bicouche lipidique	56
Figure I18 :	Mode d'insertion de la Syt 1 dans la bicouche lipidique	58
Figure I19 :	Modèle d'action de Syt 1	70
Figure I20 :	Arbre phylogénique de la famille des synaptotagmines	74
Figure R1-1 :	Syt 7 est exprimée dans les cellules insulino-sécrétoires, les cellules chromaffines et le cerveau.	87
Figure R1-2 :	Syt 9 et Syt 1 sont exprimées dans les cellules insulino-sécrétoires, les PC12 ainsi que dans le cerveau de rat et de souris.	87
Figure R1-3 :	Répartition sous cellulaire des isoformes des synaptotagmines dans les cellules MIN6 après fractionnement sur un gradient continu de saccharose.	89
Figure R1-4 :	Syt 7 n'est pas localisée sur le compartiment endosomal contenant le récepteur de la transferrine dans les cellules β pancréatiques, les cellules MIN6 ou les neurones.....	91
Figure R1-5 :	Syt 7 n'est pas localisée sur les vésicules sécrétoires dans les cellules β pancréatiques, les cellules MIN6 ou PC12.	92
Figure R1-6 :	Syt 9 est localisée sur les VLCD dans les cellules insulino-sécrétoires mais pas dans les PC12.	94
Figure R1-7 :	Syt 9 et Syt 1 ne sont pas portées par le même compartiment cellulaire dans les cellules insulino sécrétoires et les neurones	95
Figure R1-8 :	Syt 7 est partiellement co-localisée avec LAMP-1 dans les PC12 et les neurones d'hippocampe embryonnaires en culture mais pas dans les cellules insulino-sécrétoires.	96
Figure R1-9 :	Syt 7 est co-localisée avec Ti-VAMP dans les PC12 mais pas dans les cellules insulino-sécrétoires.	97

Figure R1-10 : La surexpression de Syt 9 sous la forme sauvage ou mutée pour les sites de coordination du calcium n'a pas d'effet sur la sécrétion stimulée par le KCl.....	99
Figure R1-11 : Surexpression de Syt 9 dans les cellules HIT-T15.....	100
Figure R2-1 : Specificity of immunopurified anti-Syt 8 antibody.	117
Figure R2-2 : Expression of synaptotagmin 8 in clonal β cells, pheochromocytoma cells and brain extracts.....	118
Figure R2-3 : Subcellular distribution of synaptotagmin 8 in clonal β cells	119
Figure R2-4 : Immunoreactivity of HIT-T15 or MIN6 cells with anti-Syt 8	120
Figure R2-5 : Synaptotagmin 8 does not translocate upon increase in intracellular calcium.	121
Figure R3-1 : Position de la séquence antigénique choisie pour les anticorps polyclonaux	127
Figure R3-2 : Spécificité des anticorps polyclonaux.....	129
Figure R3-3 : Syt 10 est exprimée dans les cellules β pancréatiques et chromaffines primaires	129
Figure R3-4 : Syt 10 est exprimée dans les cellules β pancréatiques, chromaffines et les neurones d'hippocampe	131
Figure R3-5 : Syt 11 et Syt 13 sont exprimées dans les cellules insulino-sécrétoires β pancréatiques, HIT-T15 et MIN6, les cellules PC12 et le cerveau.....	133
Figure R3-6 : Répartition sous cellulaire des isoformes des synaptotagmines dans les cellules MIN6 après fractionnement sur un gradient continu de saccharose.....	135
Figure R3-7 : Syt 11 n'est pas co-localisée avec les marqueurs des vésicules sécrétoires dans les cellules MIN6 et PC12	136
Figure R3-8 : Syt 11 n'est pas co-localisée avec les marqueurs du compartiment intermédiaire ou de l'appareil de Golgi	137
Figure C1 : Localisation des isoformes des Syt dans une cellule insulino-sécrétoire type	157
Figure M1 : Conditions de PCR pour l'amplification des séquences codantes pour Syt 9 à 11 et Syt 13.....	152
Figure M2 : Conditions de PCR pour l'introduction des mutations sur la séquence codante pour la protéine Flag-Syt 9.	156
Figure M3 : Choix des séquences peptidiques pour l'immunisation des lapins	160
Tableau I1 : Localisation des isoformes des Syt dans le pancréas endocrine _____	83
Tableau M1 : Anticorps primaires utilisés pour en immunofluorescence _____	160
Tableau M2 : Anticorps primaires utilisés pour en immunodétection (WB) _____	160
Tableau M3 : Amplification des séquences codantes pour les fragments cytosoliques de Syt 9 à Syt 13 _____	163
Tableau M4 : Introduction des mutations dans la séquence codante pour Syt 9 _____	167
Tableau M5 : Séquence de chaque peptide utilisé pour la production des anticorps polyclonaux _____	170
Tableau M6 : Composition des milieux de culture des lignées cellulaires utilisé _____	172

INTRODUCTION

I/ LES MÉCANISMES CELLULAIRES DE LA SÉCRÉTION D'INSULINE

A/ L'homéostasie du glucose

La concentration plasmatique de glucose varie peu (entre 3,3 et 11 mM) malgré des apports et des besoins extrêmement variables d'un moment à l'autre de la journée. Le maintien de la glycémie normale fait appel à deux systèmes de régulation distincts selon qu'il s'agisse d'une période de jeûne ou d'une période suivant la prise d'un repas, la période post-prandiale.

En période de jeûne la concentration de glucose circulant est faible, l'organisme doit donc utiliser ses réserves afin de maintenir la glycémie constante. Le glucagon, sécrété par le pancréas, mais aussi la noradrénaline ou le cortisol vont orienter le métabolisme vers la néoglucogenèse et la glycogénolyse. La néoglucogenèse a essentiellement lieu dans le foie, mais également dans les reins. Elle permet la conversion en glucose des triglycérides venant du tissu adipeux ainsi que des protéines et du glycogène stockés dans le foie. En complément de la néoglucogenèse, la glycogénolyse permet aux muscles d'utiliser localement le glycogène stocké. Lors d'un jeûne prolongé, les organes périphériques mettent en place des systèmes "d'économie" au profit du système nerveux pour lequel la principale source d'énergie reste le glucose. Toutefois, l'utilisation des acides gras libres issus du catabolisme des triglycérides est possible par les cellules du système nerveux pour alimenter le cycle de Krebs et fournir de l'énergie en cas d'hypoglycémie prolongée.

En période postprandiale le taux de glucose circulant est élevé, l'augmentation de la sécrétion d'insuline et la diminution de la sécrétion de glucagon permettent d'orienter le métabolisme vers la mise en réserve des nutriments. Le foie, par la glycogénèse, stocke le glucose sous forme de glycogène et métabolise les acides aminés en triglycérides. Les acides gras sont accumulés dans le tissu adipeux également sous forme de triglycérides. Les acides aminés circulant sont utilisés par les muscles pour la synthèse de protéines. L'insuline exerce son effet hypoglycémiant en agissant au niveau des cellules musculaires, des adipocytes et des hépatocytes. Ses effets principaux sont une augmentation de l'entrée et de l'utilisation du glucose par ces

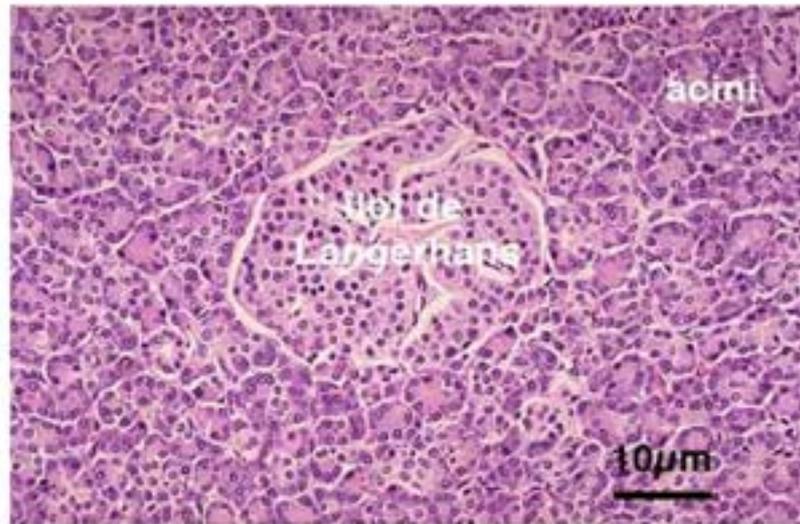


Figure I1 : Coupe histologique de pancréas humain

Sur cette coupe de pancréas humain, colorée à l'éosine et à l'hématoxyline, on peut observer un îlot de Langerhans, structure endocrine au coeur du pancréas exocrine. Image obtenue sur la banque d'image "The Internet Pathology Laboratory for medical education"

cellules et une diminution de la néoglucogenèse hépatique. Dans les muscles (cardiaque et squelettique) on observe une augmentation du nombre de transporteurs du glucose GLUT4 présents à la membrane plasmique, une stimulation de la glycogénèse et de la synthèse de protéines. Dans les adipocytes, le nombre de transporteurs du glucose GLUT4 présents à la membrane plasmique augmente aussi et la synthèse des triglycérides est stimulée. Dans le foie, les cascades de transformation du glucose en glycogène et en acides gras sont également activées par l'insuline (Williams Text Book of Endocrinology).

B/ Le pancréas

Le pancréas est un organe dont la fonction est double, à la fois endocrine et exocrine. Le pancréas exocrine est responsable de la sécrétion dans le duodénum d'un fluide alcalin contenant une vingtaine d'enzymes digestives (trypsine et chymotrypsine par exemple). Ce fluide, par sa richesse en bicarbonates, permet de neutraliser le bol alimentaire très acide à la sortie de l'estomac. Il permet également la coupure par les enzymes digestives des aliments en nutriments absorbables par l'intestin. Au cœur du pancréas exocrine, les cellules endocrines sont regroupées autour des capillaires et forment les îlots de Langerhans qui ne représentent pas plus de 1 à 3% de la masse totale du pancréas (Figure I1).

Les îlots de Langerhans sont constitués de quatre types cellulaires capables de sécréter des hormones intervenant dans l'homéostasie du glucose. Les cellules β majoritaires au sein de l'îlot, possèdent chacune en moyenne 10 000 granules contenant l'insuline (Eliasson et al., 1997) et sont principalement situées au centre de l'îlot. Ces cellules sont en contact étroit avec les cellules α contenant le glucagon, les cellules δ contenant la somatostatine et quelques cellules PP qui libèrent le peptide pancréatique. Cette structure anatomique est traversée par de nombreux capillaires sanguins fenestrés et elle est fortement innervée.

Le rôle du pancréas endocrine se situe dans le maintien de l'homéostasie du glucose. Il est capable de sécréter des hormones hyper et hypoglycémiantes : l'insuline, le glucagon, la somatostatine et le peptide PP. L'insuline est la seule hormone hypoglycémiante alors que le glucagon, avec l'adrénaline et la cortisone, est une des

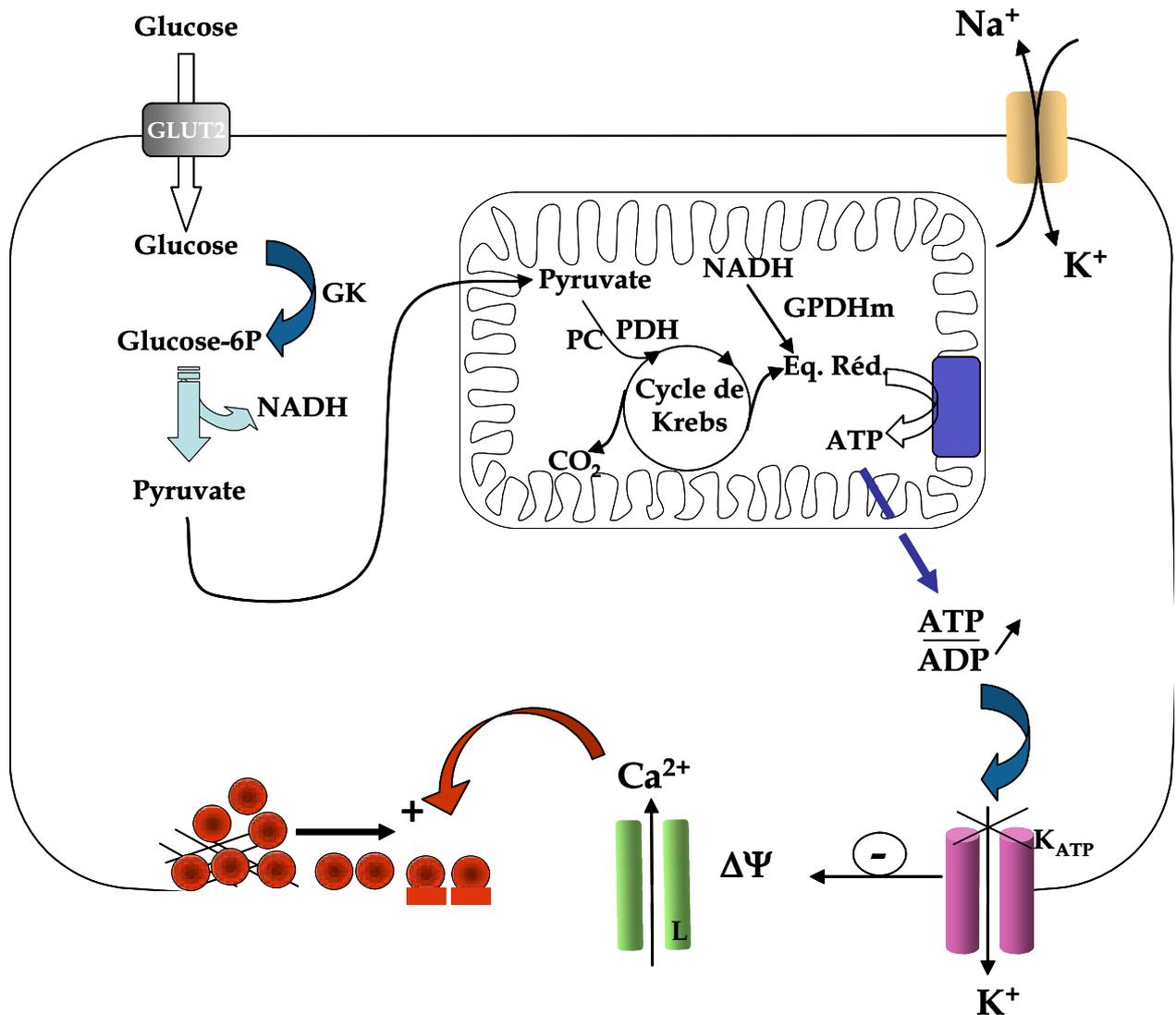


Figure I2 : De l'augmentation de la glycémie à la sécrétion d'insuline

Le glucose circulant entre dans la cellule β par son transporteur GLUT2, et est aussitôt phosphorylé par la glukokinase (GK). Le pyruvate est pris en charge par la pyruvate déshydrogénase (PDH), la pyruvate carboxylase (PC) et entre dans le cycle de Krebs. Le NADH est pris en charge par la glycérol phosphate déshydrogénase mitochondriale (GPDHm). La production d'ATP qui s'en suit augmente le rapport entre [ATP] et [ADP] dans le cytoplasme et entraîne la fermeture des canaux potassiques dépendants de l'ATP (K_{ATP}). L'arrêt de l'efflux de potassium provoque une diminution du potentiel transmembranaire, normalement maintenu par la Na^+/K^+ ATPase, et l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage de type L (L). L'entrée de calcium stimule la sécrétion d'insuline.

hormones hyperglycémiantes. La somatostatine joue un rôle inhibiteur sur la sécrétion d'insuline et de glucagon. Quant au peptide PP, son rôle physiologique est inconnu.

La sécrétion du glucagon et de l'insuline est sous la dépendance du taux plasmatique de glucose et de facteurs hormonaux extra-pancréatiques comme les incrétines (voir paragraphe D/). Ceci implique que les cellules α et β sont sensibles à la concentration de glucose circulant et sont capables de déclencher si nécessaire la sécrétion de l'hormone adéquate.

C/ De l'augmentation de la glycémie à la sécrétion d'insuline

1 - Le métabolisme du glucose dans les cellules β

Dans la cellule β , le métabolisme du glucose, par la voie oxydative du cycle de Krebs, permet le couplage entre le taux de glucose circulant et la sécrétion d'insuline (figure I2). Le glucose entre dans la cellule β par un de ses transporteurs, GLUT2 qui permet un passage facilité (Tiedge and Lenzen, 1991). Le flux entrant est uniquement régulé par le gradient de concentration entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule. Afin de maintenir un flux entrant constant, essentiel au couplage entre glycémie et sécrétion d'insuline, le glucose est phosphorylé par la glucokinase dès son entrée dans la cellule β . Cette réaction est l'étape limitante de la glycolyse et possède une constante de Michaelis (K_m) de 10 mM de glucose. Cette valeur est comparable à l' EC_{50} ¹ de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (Deeney et al., 2000b), c'est pourquoi la glucokinase est considérée comme le "senseur" du glucose dans la cellule β . Le glucose 6-phosphate produit par cette réaction enzymatique entre dans la chaîne métabolique de la glycolyse qui produit le pyruvate ainsi que deux équivalents réducteurs (NADH).

Le pyruvate passe dans la mitochondrie où, grâce à la pyruvate carboxylase (PC) ou la pyruvate deshydrogénase (PDH), il entre dans le cycle de Krebs. Les équivalents réducteurs produits par la glycolyse ainsi que ceux issus du métabolisme du pyruvate sont pris en charge par la chaîne respiratoire. La production d'un gradient de protons permet une augmentation du rapport entre concentration d'ATP (Adénoside

¹ EC_{50} : Concentration de glucose pour laquelle la sécrétion d'insuline est égale à 50% de la valeur maximale.

triphosphate) et concentration d'ADP (adénoside diphosphate) dans la mitochondrie, puis dans le cytoplasme.

La cellule β est une cellule excitable qui, au repos, possède un potentiel transmembranaire de -70 mV (Ashcroft and Rorsman, 1989). Ce potentiel membranaire est maintenu par la sortie des ions potassium au travers des canaux K^+ dépendants de l'ATP (K_{ATP}). La modification du rapport $[ATP]/[ADP]$ va provoquer la fermeture des canaux K_{ATP} (Ashcroft et al., 1984). La dépolarisation membranaire qui s'en suit induit l'ouverture des canaux calciques voltage dépendants (Arkhammar et al., 1987) qui sont majoritairement de type L dans les cellules β (Fisher and Bourque, 2001).

Ceci permet une augmentation importante mais locale de la concentration intracellulaire en calcium libre ($[Ca^{2+}]_i$). Autour de la zone d'entrée, la $[Ca^{2+}]_i$ peut atteindre 100 μM , soit mille fois la concentration basale (Heidelberger et al., 1994). Cette variation est l'élément déclencheur de l'exocytose des vésicules contenant l'insuline et donc la libération de l'hormone dans le flux sanguin. Les mécanismes moléculaires de cette étape finale sont détaillés plus loin.

2 - La cellule β : une cellule spécialisée

Le pyruvate produit par les premières étapes de la glycolyse peut entrer dans le cycle de Krebs mais peut également être transformé en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH). Cette voie qui ne passe donc pas par le cycle de Krebs est utilisée par les cellules musculaires, par exemple, en condition anaérobie. La formation de lactate peut cependant être considérée comme une fuite du glucose car elle ne produit pas d'ATP. La faible activité de la LDH dans les cellules β permet l'orientation de la glycolyse vers le cycle de Krebs et donc un meilleur rendement de formation d'ATP (Sekine et al., 1994).

La deuxième particularité enzymatique des cellules insulino-sécrétoires est la forte activité de la glycérol phosphate déshydrogénase mitochondriale (GPDHm). Cette enzyme permet l'utilisation par la chaîne respiratoire mitochondriale des équivalents réducteurs produits par la glycolyse. Cette enzyme a une activité 60 fois plus importante que son équivalent hépatique (Sekine et al., 1994). La fonction de la cellule β est de répondre à l'élévation du taux plasmatique de glucose et la sécrétion est stimulée par l'augmentation du rapport $[ATP]/[ADP]$. Pour que le système soit

sensible il faut donc un bon rendement entre le métabolisme du glucose et la production d'ATP. La faible activité de la LDH et la forte activité de la GPDHm permettent à la cellule β d'utiliser au maximum le glucose. Jusqu'à 90% du carbone venant de la glycolyse est oxydé dans la cellule β (Schuit et al., 1997), ce qui est un taux bien supérieur à celui des autres types cellulaires.

D/ Les systèmes d'amplification de la sécrétion d'insuline

A la concentration de glucose circulant s'ajoutent, pour réguler la sécrétion d'insuline par le pancréas, des boucles de régulation hormonale ou neuronale. Des agents pharmacologiques, les sulfonylurées, modulent aussi le taux d'insuline libérée par la cellule β pancréatique (figure I3).

1 - Les incrétines

Les incrétines (GIP, glucose-dependant insulintropic peptide et GLP-1 glucagon-like peptide-1) sont des peptides hormonaux produits et sécrétés par les cellules L de l'intestin lors de l'ingestion de nutriments. Le GLP-1, en se fixant sur son récepteur présent à la surface des cellules β , amplifie la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose. Grâce à cette hormone, la réponse du pancréas à une élévation de la glycémie est plus forte lorsque le sucre est ingéré que lorsque la stimulation est produite par la même quantité de sucre en injection intraveineuse (Gromada et al., 1998). Le récepteur du GLP-1 est couplé à une protéine G hétérotrimérique G_s , la fixation du ligand sur son récepteur active par son intermédiaire l'adénylate cyclase (AC). L'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) produit par l'AC est un second messenger qui permet l'activation de la protéine kinase A (PKA). Les effets majeurs de la PKA sur la cellule sont la réorganisation du cytosquelette, favorisant le mouvement des vésicules vers la membrane plasmique, la phosphorylation de protéines impliquées dans la sécrétion et l'activation de facteurs de transcription du gène de l'insuline. D'autres effets sont supposés, comme la phosphorylation des canaux K_{ATP} ou des canaux calciques dépendants du voltage de type L ce qui provoquerait une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ (pour revue voir Gromada et al., 1997).

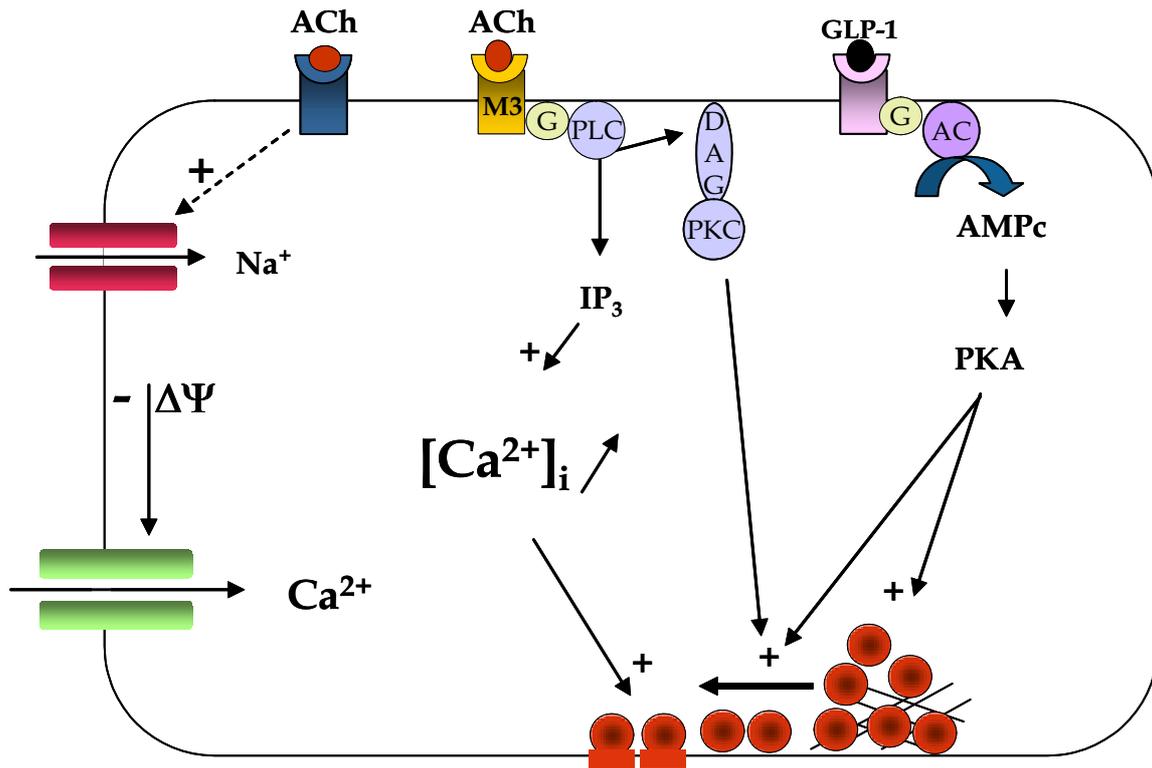


Figure I3 : Les systèmes d'amplification de la sécrétion d'insuline

Les incrétines comme le GLP-1, en se fixant sur leur récepteur activent l'adénylate cyclase (AC) et produisent de l'adénoside monophosphate cyclique (AMPc). L'AMP cyclique active à son tour la protéine kinase A (PKA) qui stimule la sécrétion.

Lorsque l'acétylcholine (ACh) se lie à son récepteur de type muscarinique (M3), l'activation de la phospholipase C (PLC) permet la production d'inositol-3-phosphate (IP₃) dont le principal effet est l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire [Ca²⁺]_i. La production de diacylglycérol (DAG) et l'augmentation de [Ca²⁺]_i activent la protéine kinase C (PKC) qui active également la sécrétion d'insuline.

2 - L'acétylcholine

Le pancréas est innervé par des fibres parasympathiques qui libèrent l'acétylcholine. Les cellules β possèdent les récepteurs muscariniques M3 à l'acétylcholine couplés aux protéines G et à la phospholipase C (PLC). La production de diacylglycérol (DAG) et d'inositol triphosphate (IP_3) par la PLC permet l'amplification de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose principalement grâce à l' IP_3 qui, en se fixant sur son récepteur, provoque la libération du calcium des compartiments intracellulaires (réticulum endoplasmique et appareil de Golgi notamment) (Gilon and Henquin, 2001). De plus, le DAG est nécessaire à la translocation et à l'activation de la protéine kinase C (PKC). Parmi les nombreuses isoformes de la PKC, la translocation des deux isoformes α et ϵ a été démontrée dans la cellule β . L'inhibition par un peptide de cette translocation provoque une inhibition de la sécrétion d'insuline de 40% dans les pancréas perfusés de rats (Yedovitzky et al., 1997). D'autres études sur des cellules β de souris ont mis en évidence une diminution du courant calcique au travers des canaux dépendants du voltage suite à la "down regulation" de la PKC_α par l'ester de phorbol PMA (Mendez et al., 2003; Platano et al., 1996). Ces résultats impliquent un lien entre la PKC_α et la sécrétion d'insuline. Cependant, d'autres études plus récentes qui ont utilisé des inhibiteurs spécifiques ou des dominants négatifs de chaque isoforme n'ont pas retrouvé cet effet de la PKC_α sur la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (Carpenter et al., 2004; Mendez et al., 2003). En revanche, dans une lignée cellulaire insulino-sécrétoire, les INS-1E, la PKC_ϵ aurait un effet amplificateur sur la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (Mendez et al., 2003). Le rôle exact de chaque isoforme de la PKC dans la sécrétion d'insuline est encore à élucider. Il serait notamment intéressant de voir l'effet d'inhibiteurs spécifiques des isoformes pour s'affranchir de l'action bien peu spécifique des esters de phorbol sur cette famille d'enzymes.

En dehors de son action par l'intermédiaire des récepteurs muscariniques M3, l'acétylcholine est capable de dépolariser la membrane des cellules β par un mécanisme encore mal compris. L'augmentation de la perméabilité de la membrane aux ions sodium provoquerait une activation des canaux calciques dépendant du voltage et donc la stimulation de la sécrétion d'insuline (pour revue voir Gilon and Henquin,

2001). Enfin, une action directe de l'acétylcholine sur les canaux K^+ dépendants de l'ATP est à envisager, et permettrait d'en augmenter la sensibilité à l'ATP (Nakano et al., 2002).

3 - Les régulations autocrines et paracrines de la sécrétion d'insuline

Les cellules α et β ont des fonctions opposées, l'une produit une hormone hyperglycémisante, l'autre hypoglycémisante. Pour que l'ensemble fonctionne de concert, des régulations paracrines sont nécessaires. La sécrétion de glucagon, par exemple, est inhibée par la somatostatine et l'insuline (Barg, 2003). Des récepteurs au glucagon sont également présents à la surface des cellules β pancréatiques (Kieffer et al., 1996). *Ex vivo*, le glucagon a un effet stimulateur sur la sécrétion d'insuline par le pancréas de rat. Cet effet est surprenant car le rôle du glucagon est normalement opposé à celui de l'insuline dans la régulation de la glycémie. Cependant, *in vivo*, en période d'hypoglycémie, la sécrétion du glucagon est associée à la sécrétion de miniglucagon. Ce peptide de 11 acides aminés, correspondant à l'extrémité carboxy-terminal du glucagon, a un effet inhibiteur sur la sécrétion d'insuline par la cellule β pancréatique. Bien que le miniglucagon ne représente que 3% environ de la quantité de glucagon libéré, son affinité pour son récepteur étant 1000 fois plus forte, il est capable de compenser l'effet insulino-trope du glucagon (Dalle et al., 1999).

Lorsque la présence du récepteur de l'insuline ainsi que deux de ses substrats, insulin receptor substrate 1 et 2 (IRS-1 et IRS-2), a été démontrée sur les cellules β pancréatiques de rat, le rôle autocrine de l'hormone sur sa propre sécrétion a été envisagé (Velloso et al., 1995). Des mesures directes de la sécrétion au niveau d'une cellule unique par ampérométrie¹ ont pu mettre en évidence l'effet stimulateur de l'insuline sur la sécrétion stimulée par le glucose par une cellule β de souris (Aspinwall et al., 1999). La stimulation du récepteur de l'insuline dans les cellules β active également la translocation du facteur de transcription PDX-1, responsable de

¹ Ampérométrie : Technique électrophysiologique permettant la mesure directe des événements de fusion, et de leurs caractéristiques cinétiques, au niveau d'une cellule unique avec une très bonne résolution temporelle (ms).

Les catécholamines (la dopamine par exemple) libérées lors de l'exocytose, s'oxydent naturellement dans le milieu extracellulaire. Les électrons libérés suite à cette oxydation sont captés par une électrode et produisent un courant électrique. Une fois amplifié, le signal produit est représentatif d'un événement singulier de fusion.

L'activation de la transcription du gène codant pour l'insuline (Melloul et al., 2002). L'effet autocrine majeur de l'insuline sur les cellules β est donc une augmentation de sa propre synthèse.

4 - Les sulfonylurées

Les canaux K_{ATP} , dont la fermeture permet la dépolarisation membranaire de la cellule β et la sécrétion d'insuline, sont constitués de deux types de sous-unités (Inagaki et al., 1995). Les quatre sous-unités kir6.2 forment le canal à proprement parlé et les quatre sous-unités SUR1 qui leur sont associées en régulent l'activité (Bataille, 2002). Les agents pharmacologiques de la classe des sulfonylurées, en se liant aux sous-unités SUR1, provoquent la fermeture des canaux K_{ATP} et donc stimulent la sécrétion d'insuline. Ils sont utilisés comme agents thérapeutiques dans le diabète de type 2. L'action hypoglycémiant des sulfonylurées ne semble pas être confinée à la régulation de la fermeture du canal K_{ATP} . Les granules contenant l'insuline doivent au cours de leur maturation subir un processus d'acidification (voir le paragraphe II/A). La diminution du pH à l'intérieur des vésicules est sous la dépendance d'une pompe à protons dépendante de l'ATP. L'entrée des protons est accompagnée de l'entrée d'ions chlorure Cl^- pour maintenir l'isotonie. Le canal perméable aux ions Cl^- est, comme le canal K_{ATP} , régulé par les sulfonylurées qui, en stimulant l'entrée des ions chlorure, exerceraient une action tonique sur la maturation des vésicules et donc sur la sécrétion d'insuline (Renstrom et al., 2002).

E/ La sécrétion pancréatique d'insuline

1 - Le synchronisme au sein d'un îlot

La sécrétion d'insuline par le pancréas, quelque soit son amplitude, oscille à une fréquence de 5 à 10 min (Song et al., 2000). Ces variations d'insulinémie périphérique, mesurées *in vivo*, sont retrouvées *ex vivo* au niveau d'un pancréas isolé mais aussi *in vitro* au niveau cellulaire (Gilon et al., 2002). L'oscillation de la sécrétion d'insuline est donc synchronisée dans l'ensemble du pancréas. Ravier et al. ont montré une concordance entre l'oscillation de la sécrétion d'insuline et la concentration de calcium intracellulaire dans les îlots isolés de souris (figure I4) (Ravier et al., 2002).

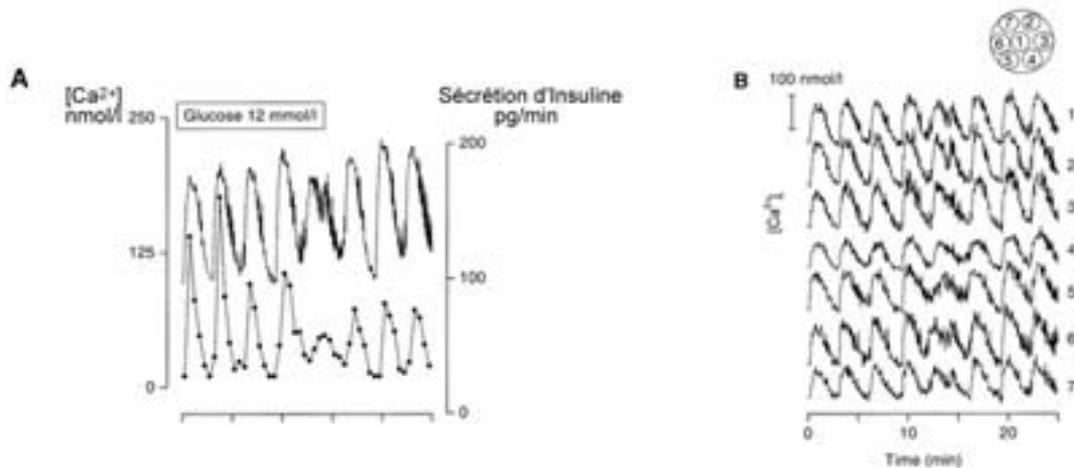


Figure I4 : Le synchronisme au sein de l'îlot

Les oscillations de la concentration de calcium intracellulaire correspondent à des oscillations de libération d'insuline. Les îlots isolés de souris sont perfusés avec une solution saline contenant une concentration constante de glucose de 12 mM. La concentration en insuline est mesurée par dosage radio-immunologique dans le milieu prélevé toutes les 30 s. Les îlots ont été préalablement perfusés dans une solution de fura-PE3. Le rapport de la fluorescence mesurée à 340 puis 380 nm reflète ainsi la concentration en calcium dans la cellule. La partie **A** est la somme des oscillations mesurées dans les différentes zones de l'îlot. Pour chacune des 7 zones de l'îlot, détaillées dans la partie **B**, les oscillations calciques sont mesurées. D'après Ravier *et al*, *Diabetologia*, 2002. **45**(8): p. 1154-63

Le synchronisme de la sécrétion d'insuline passe donc par des oscillations homogènes de la $[Ca^{2+}]_i$ dans l'îlot. C'est ce que montre cette expérience. Ce phénomène permet une réponse globale homogène à l'hyperglycémie. Les oscillations mesurées de la $[Ca^{2+}]_i$ sont d'ailleurs plus régulières au sein d'un groupe de cellules que dans une cellule isolée. Cette régularité augmente avec le nombre de cellules couplées (Jonkers et al., 1999).

2 - La sécrétion pancréatique d'insuline, mesurée en fonction du temps, est biphasique

La sécrétion d'insuline d'un pancréas isolé, perfusé de façon constante pendant 30 min par une concentration stimulante de glucose (6.9 mM pour le pancréas de rat), se fait en deux phases. Un premier pic apparaît une à deux minutes après le début de la stimulation puis, après un retour de l'insulinémie à un niveau presque basal, la deuxième phase se met en place et permet une augmentation progressive de la sécrétion d'insuline (Figure I5). Cette réponse biphasique, mesurée *in vitro* ou *ex vivo* dans un pancréas perfusé, n'est jamais observée *in vivo*. En effet, l'augmentation de la glycémie dans l'organisme n'est jamais si abrupte ni maintenue constante pendant une période aussi longue. Pourtant, il est aujourd'hui clairement admis que les mécanismes moléculaires permettant cette première phase de la réponse sont les premiers touchés dans le diabète de type 2 (DT2) (Gerich, 1998).

Les mécanismes cellulaires mis en jeu dans chaque phase de la réponse ont été largement étudiés. Deux hypothèses distinctes permettent d'expliquer ce profil biphasique de la sécrétion d'insuline.

La première, qui est la plus souvent reprise dans la littérature, a été développée par le groupe de P.Rorsman et F.Ashcroft et implique deux types de vésicules contenant l'insuline (Rorsman et al., 2000). Cette théorie a été illustrée grâce à la combinaison de méthodes électrophysiologiques, dont la mesure de capacitance¹. Les cellules β pancréatiques isolées de souris pour lesquelles la dépolarisation membranaire est forcée par la méthode de "voltage clamp" (passage de -70 à 0 mV) sécrètent de

¹ La Capacitance d'une cellule reflète la mesure de sa surface membranaire. Lorsqu'une vésicule fusionne avec la membrane plasmique la surface de la cellule, et donc sa capacitance, augmentent. Cette méthode permet de mesurer l'ensemble des événements de fusion ayant lieu au niveau d'une cellule unique avec une résolution temporelle très grande, de l'ordre de la ms.

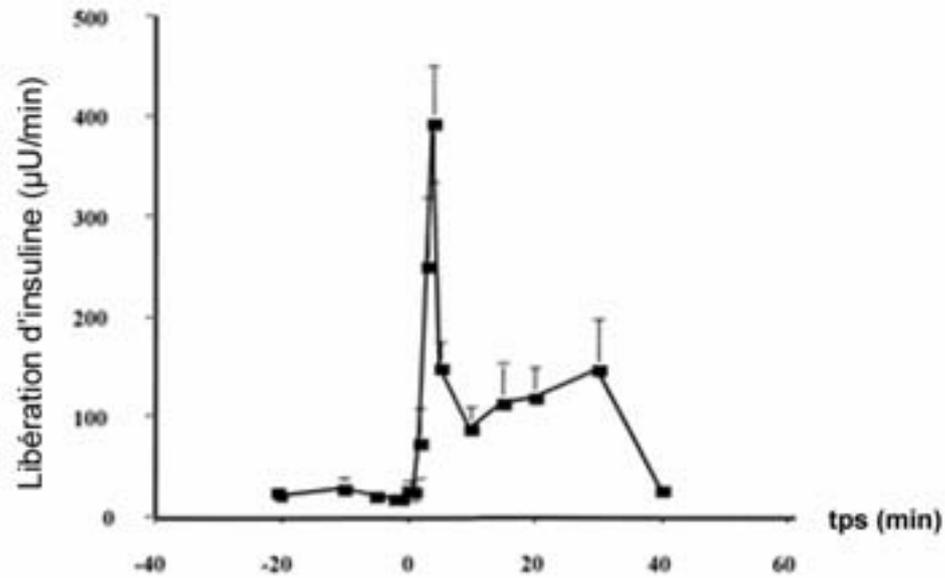


Figure I5 : La sécrétion pancréatique d'insuline en fonction du temps est biphasique

Les îlots de rat fraîchement isolés sont équilibrés dans un tampon de Krebs Ringer contenant 3,3 mM de glucose pendant 40 min. Les îlots sont ensuite stimulés par l'incubation dans une solution contenant 6,9 mM de glucose, pendant 30 min. On observe une première phase déclenchée 2 min après le début de la stimulation et qui perdure pendant 8 min. La deuxième phase est observée après un retour à un niveau presque basal de la sécrétion d'insuline. Cette deuxième phase augmente progressivement jusqu'à l'arrêt de la stimulation.

D'après : Nesher, R. and E. Cerasi, *Modeling phasic insulin release: immediate and time-dependent effects of glucose*. *Diabetes*, 2002. **51 Suppl 1**: p. S53-9

l'insuline. La sécrétion est mesurée par la mesure de la variation de capacitance (figure I6). Lors d'une dépolarisation unique, l'augmentation de la capacitance est de 50 fFarad (fF). Lors de l'application d'un train de dépolarisations (14 dépolarisations successives à une fréquence de 500 Hz) la capacitance de la cellule β augmente par palier. A chaque palier, l'augmentation de capacitance s'amenuise. Lorsque l'augmentation totale de capacitance atteint environ 125 fF, il n'est plus possible d'observer d'accroissement de la surface membranaire, alors même que les dépolarisations sont maintenues. Ce plateau dans la courbe de capacitance correspondrait, selon les auteurs, à l'épuisement du compartiment contenant les vésicules prêtes à fusionner appelé le compartiment de vésicules rapidement libérables (CRL). La deuxième phase de la sécrétion met alors en jeu le compartiment de réserve (CR) dont le recrutement dépend de nombreux facteurs comme l'ATP mais aussi la $[Ca^{2+}]_i$ (Rorsman et al., 2000; Straub and Sharp, 2002).

Cependant, cette théorie implique que le compartiment capable de fusionner rapidement soit limité et ne contienne que peu de granules. Pourtant, la capacité de la cellule β à répondre avec une amplitude croissante à une stimulation croissante de glucose a amené d'autres auteurs à proposer une théorie fondée sur la cinétique de la sécrétion d'insuline (Nesher and Cerasi, 2002). Lorsqu'un pancréas de rat isolé est stimulé de façon répétitive (8,9 mM de glucose pendant 40 min, 20 min de latence, puis à nouveau 8,9 mM de glucose) la sécrétion d'insuline à la deuxième stimulation est plus de 2 fois plus forte qu'à la première. Il existe également une inhibition dépendante du temps (Time Dependant inhibition TDI). Cette inhibition est mise en œuvre lors d'une stimulation de la sécrétion d'insuline par un concentration de glucose faible (6,9 mM). Dans ce cas aucune potentialisation dépendante du temps n'est mise en jeu. Ainsi, lorsque le pancréas est perfusé avec 6,9 mM de glucose pendant 5 min, puis à nouveau 6,9 mM de glucose 5 min après, l'intensité de la deuxième réponse est plus faible que la première. Cette deuxième expérience met en évidence l'inhibition dépendante du temps (TDI). Les deux composantes, TDP et TDI, sont présentes à chaque stimulation (figure I7). A la sécrétion initiale, déclenchée par l'augmentation du calcium intracellulaire, s'ajoutent donc le facteur inhibiteur et le facteur potentialisateur. Les modélisations mathématiques de chacun de ces éléments de la réponse pancréatique puis leur somme permet de retrouver la courbe biphasique de libération de l'insuline (Nesher and Cerasi, 2002).

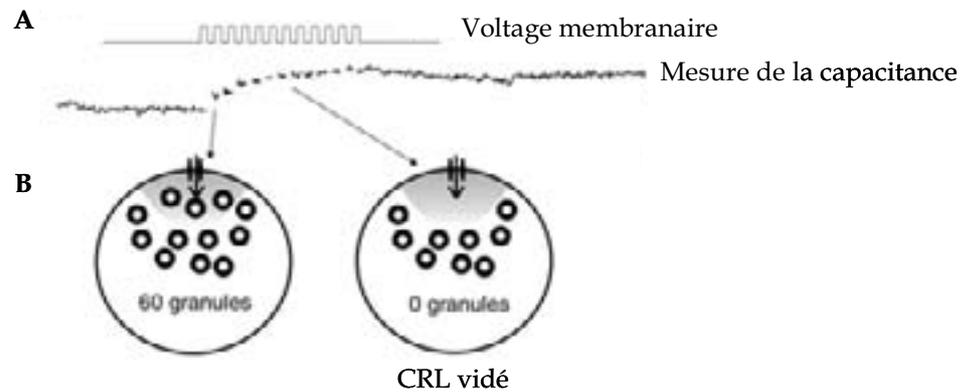


Figure I6 : La première phase de la sécrétion d'insuline est assurée par l'exocytose du compartiment rapidement libérable (CRL)

La stimulation répétitive à haute fréquence peut être utilisée pour mettre en évidence le CRL par un train de dépolarisation (14 dépolarisations à une fréquence de 500Hz) est appliqué (A). L'augmentation de capacitance atteint un maximum de 125 fFarad (fF). (B) Schématisation de la situation au début de la dépolarisation et après la déplétion du CRL. D'après Rorsman, P., et al., *The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion*. News Physiol Sci, 2000. 15: p. 72-77

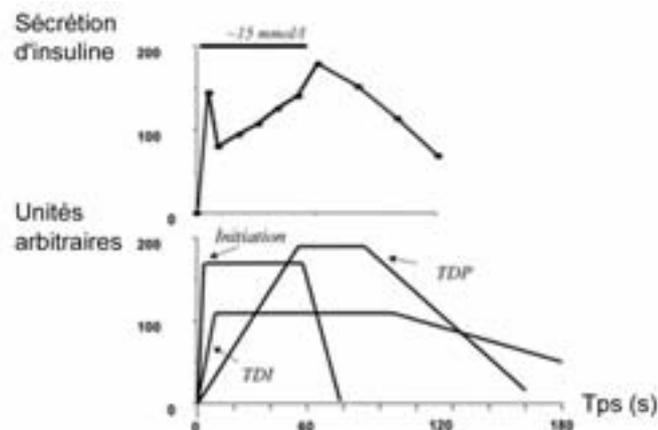


Figure I7: Modélisation de la sécrétion biphasique d'insuline

(A) : Sécrétion d'insuline d'un pancréas de rat perfusé avec une solution de 15 mM de glucose pendant 60 min. (B) : Modélisation des trois composantes de la sécrétion; la phase d'initiation qui est enclenchée très rapidement après le début de la stimulation, la potentialisation dépendante du temps (TDP) et l'inhibition dépendante du temps (TDI). La balance entre les signaux négatifs et les signaux positifs module la sécrétion d'insuline pour donner une réponse biphasique classique. D'après : Nesher, R. and E. Cerasi, *Modeling phasic insulin release: immediate and time-dependent effects of glucose*. Diabetes, 2002. 51 Suppl 1: p. S53-9.

3 – Les facteurs de régulation de la sécrétion indépendante des canaux K⁺ dépendants de l'ATP

La première phase de la sécrétion d'insuline par une cellule β est observée lors d'une stimulation par 50 mM de chlorure de potassium (KCl). Les ions K⁺ induisent la dépolarisation membranaire et l'augmentation intracellulaire de calcium mais aucune des étapes d'amplification permettant le maintien de la sécrétion, et donc de la seconde phase, n'est mise en jeu. La deuxième phase de la sécrétion d'insuline par les cellules β n'est observée que lorsque l'agent stimulant est métabolisable (glucose, leucine ou arginine). Cette deuxième phase est donc également appelée sécrétion indépendante des canaux K⁺ dépendants de l'ATP. Les mécanismes de régulation qui permettent de recruter les vésicules du CR et donc d'augmenter la taille du CRL pour déclencher et maintenir cette deuxième phase ne sont pas connus. Cependant plusieurs candidats existent ; les adénosides ou guanosides di et tri phosphates, le glutamate et enfin le malonyl-CoA. Pour chacun de ces candidats potentiels, il existe des études contradictoires confirmant et infirmant ces hypothèses.

La balance entre ATP/ADP, déjà régulatrice de la première phase rapide de sécrétion, pourrait être un régulateur de la seconde phase. La variation concomitante de la concentration en ATP, ou en GTP (guanoside triphosphate), et la concentration de glucose permettraient la modulation de la sécrétion en fonction de la stimulation (Detimary et al., 1996). De plus, les étapes de maturation des vésicules du compartiment de réserve vers le compartiment prêt à fusionner sont largement dépendantes de l'ATP. Cependant, une exposition prolongée à la leucine inhibe la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose en diminuant le rapport ATP/ADP mais n'a aucun effet sur la deuxième phase de libération d'insuline (Anello et al., 2001).

La régulation par le glutamate (Maechler and Wollheim, 1999) implique le transport de ce métabolite du glucose de la mitochondrie vers le cytoplasme, puis vers les granules sécrétoires. L'accumulation de glutamate dans les vésicules en augmenterait leur capacité à fusionner. Cette hypothèse a été remise en question (MacDonald and Fahien, 2000), car aucun effet n'a été observé, lors d'une augmentation du glutamate intracellulaire, sur la sécrétion d'insuline.

Le troisième régulateur potentiel pourrait être le malonyl-CoA. En effet, lorsque la glycolyse accélère, le citrate produit par le cycle de Krebs est transporté dans le

cytoplasme et transformé en malonyl-CoA par l'action combinée de l'acétyl-CoA carboxylase et de la citrate lyase. Le malonyl-CoA est capable d'inhiber le transporteur des esters d'acyl-CoA à longues chaînes, vers la mitochondrie. Ce mécanisme, permettant l'inhibition de l'oxydation des acides gras, entraîne une accumulation des esters d'acyl-CoA à longues chaînes dans le cytoplasme. Ces esters seraient à l'origine de la régulation par l'acylation des protéines impliqués dans l'exocytose (Deeney et al., 2000a). Cependant ces études ont été produites dans des lignées cellulaires qui ne possèdent pas la capacité de répondre au glucose de manière biphasique.

Bien qu'aucun de ces mécanismes proposés n'ait trouvé de confirmation stricte, on peut imaginer qu'ils ne sont pas exclusifs les uns des autres et qu'ils participent ensemble à la régulation de la deuxième phase de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose.

F/ Le diabète de type 2

Le diabète de type 2 est une maladie multifactorielle très répandue dans les pays occidentaux. Cette pathologie se caractérise à la fois par un défaut de sécrétion de l'insuline et par une insulino-résistance des tissus périphériques. L'hyperglycémie chronique des patients diabétiques provoque un dysfonctionnement de la machinerie cellulaire qui entraîne une diminution de la synthèse et de la sécrétion d'insuline par la cellule β (Marshak et al., 1999). Cependant, avant que l'hyperglycémie ne puisse être détectée ou que l'insulino-résistance n'apparaisse, la cellule β perd sa capacité de réponse biphasique à une stimulation par le glucose (Hosker et al., 1989). Les causes de ce défaut ne sont pas connues. Il est pourtant clairement démontré que la première phase, rapide et transitoire, de la sécrétion est abolie (Gerich, 1998). Les sulfonylurées, utilisées dans le traitement du diabète de type 2, restaurent cette première phase en activant le fermeture des canaux K^+ dépendants de l'ATP.

La première phase de la sécrétion d'insuline est déclenchée par l'entrée de calcium dans la cellule. La fusion de la vésicule contenant l'insuline avec la membrane plasmique met en jeu un grand nombre de mécanismes moléculaires qui ne sont que partiellement connus. La meilleure compréhension de la séquence des événements

permettant de lier la stimulation à la sécrétion dans une cellule normale nous permettra de mieux comprendre les modifications qui ont lieu lorsqu'une cellule β n'est plus capable de répondre rapidement et de façon transitoire à une augmentation de la concentration en glucose.

II / LES MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DE L'EXOCYTOSE

A / La biosynthèse de l'insuline

1 - Transcription du gène et traduction de la préproinsuline

L'insuline est le produit d'un gène unique chez l'homme porté par le chromosome 11 (deux allèles existent chez la souris et le rat) et codant pour la pré-pro-insuline (PPI).

La transcription du gène codant pour la PPI est sous l'influence de nombreux facteurs de transcription permettant à la fois la spécificité de l'expression dans les cellules β et la régulation de l'expression en fonction des besoins de la cellule (pour revue Melloul et al., 2002). Deux seulement seront cités ici pour exemple : PDX-1 (Pancreatic Duodenal Homeobox-1) et CREB ("cAMP response element binding protein").

La liaison de PDX-1 sur le promoteur du gène de la PPI est sous la dépendance du glucose par un mécanisme d'action dépendant de la phosphoinositol-3-kinase (PI3-kinase). L'activation de la transcription qui en résulte est détectable 15 à 30 min après le début de la stimulation de la cellule β pancréatique par le glucose (Wang et al., 1999).

D'autre part, la liaison de l'incrétine GLP-1 sur son récepteur, en activant l'adénylate cyclase, produit de l'AMPc. Le facteur de transcription CREB activée par l'AMPc se fixe sur le "calcium response element" (CRE) du gène de la PPI et en active la transcription. De même, le glucagon en se fixant sur son récepteur exprimé à la surface des cellules β , active la formation d'AMPc et permet l'activation du facteur de transcription CREB (Dalle et al., 2004).

L'ARNm est stabilisé dans le cytoplasme et donc accumulé, ce qui permet de garder un stock de réserve recruté lors d'une stimulation de la cellule β par le glucose (Welsh et al., 1986).

2 - Maturation de la protéine et formation des vésicules sécrétoires

La PPI possède à son extrémité amino-terminale une séquence hydrophobe de 25 acides aminés qui permet sa translocation dans le réticulum endoplasmique. Dès la

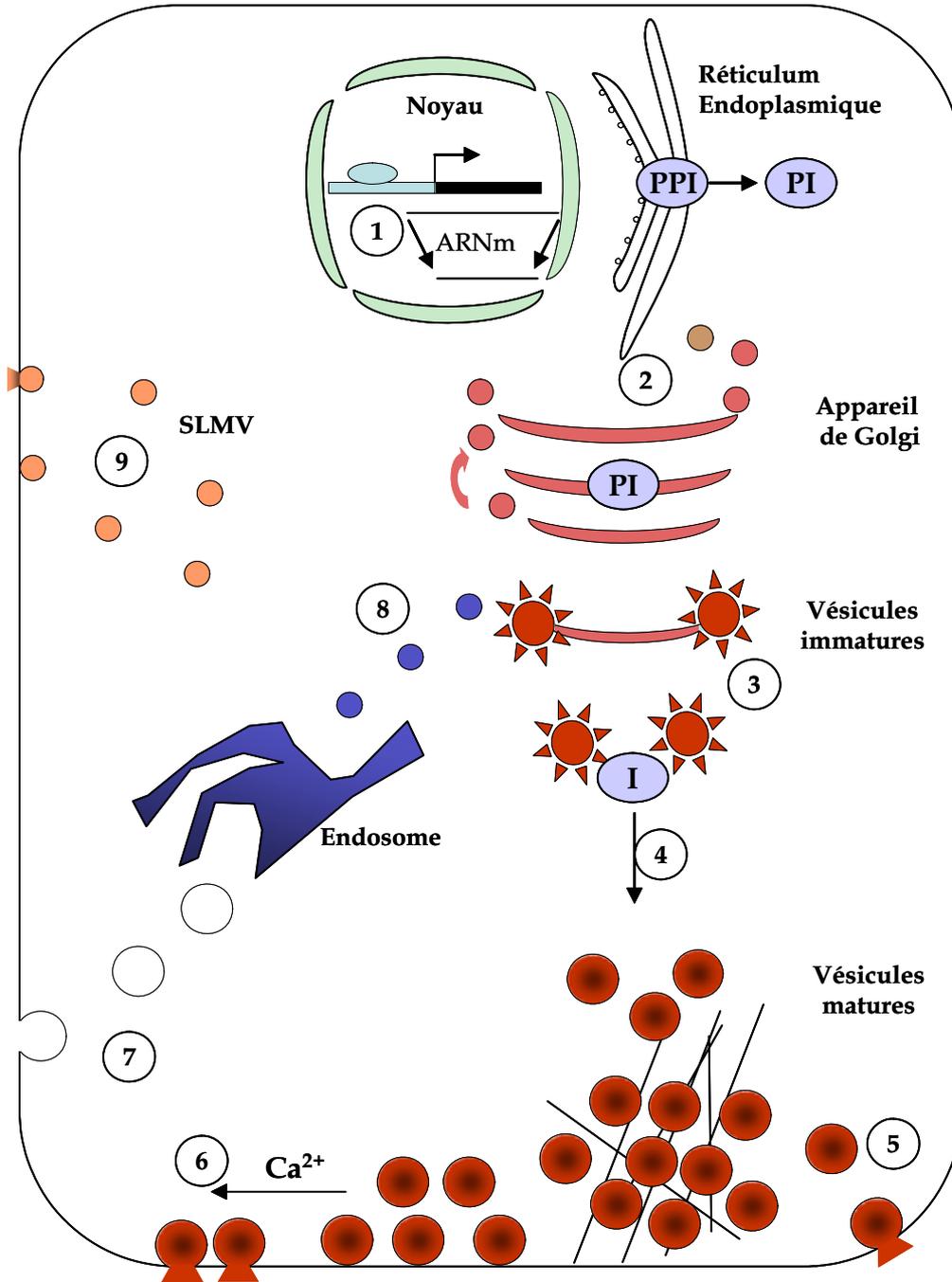


Figure I8 : La biosynthèse et le transport des vésicules sécrétoires dans la cellule β pancréatique

- ① Le gène de la préproinsuline (PPI) est sous la dépendance de nombreux facteurs de transcription comme PDX-1. L'ARNm est traduit dans le réticulum endoplasmique rugueux et la préproinsuline est aussitôt clivée en proinsuline (PI).
- ② La maturation de proinsuline se fait à travers l'appareil de Golgi.
- ③ Dans le réseau trans de l'appareil de Golgi, les vésicules immatures couvertes de clathrine sont formées.
- ④ La maturation des vésicules de sécrétion implique la perte du manteau de clathrine et la coupure par les enzymes prohormone-convertase (PC2 et PC1/3) de la proinsuline en insuline (I) et peptide C.
- ⑤ Les vésicules sécrétoires matures peuvent alors se diriger vers la voie de sécrétion constitutive
- ⑥ Dans la voie régulée leur contenu sera libéré par une stimulation calcique.
- ⑦ Après l'exocytose les vésicules sont endocytées.
- ⑧ Puis recyclées vers l'appareil de Golgi via le compartiment endosomal.
- ⑨ Les micro vésicules de type synaptique (MVTs), plus petites que les vésicules sécrétoires, ont un cycle d'exocytose-endocytose indépendant de l'appareil de Golgi.

translocation achevée, ce fragment est immédiatement clivé et la pro-insuline résultante est transportée par des microvésicules au travers du réticulum endoplasmique puis l'appareil de Golgi où elle subit des modifications post-traductionnelles comme la formation des ponts disulfures et l'hexamérisation (Huang and Arvan, 1995).

Dans le réseau trans de l'appareil de Golgi, la pro-insuline complexée est accumulée localement et les vésicules immatures recouvertes de clathrine sont formées (Wang et al., 2000). Ces vésicules immatures vont alors entrer dans la voie de sécrétion régulée. La fusion homotypique entre vésicules immatures et la perte du manteau de clathrine pourraient permettre la redistribution des protéines de la surface des granules afin de diriger les vésicules spécifiquement dans la voie de sécrétion régulée (Burgoyne and Morgan, 2003).

La maturation des vésicules passe ensuite par une étape d'acidification indispensable à la conversion de la pro-insuline en insuline. Les enzymes carboxypeptidase H et prohormone-convertase PC2 et PC1/3 sont activées lorsque le pH se situe à environ de 5 (Hutton, 1989). Le gradient de protons existant entre le cytoplasme et la lumière de la vésicule est établi grâce à une pompe H^+ -ATPase de type vésiculaire. La balance osmotique est maintenue par l'entrée concomitante d'ions chlorure au travers des canaux ClC_3 (Barg et al., 2001). Ce canal est associé, comme les canaux K^+ dépendants de l'ATP, au récepteur des sulfonyles qui en régule l'ouverture (Renstrom et al., 2002). Cette acidification est une étape indispensable à la maturation des vésicules et donc à leur exocytose car si l'on perturbe le gradient de protons par un protonophore le taux d'exocytose stimulée dans les cellules β pancréatiques de souris est diminué de 80% (Barg et al., 2001).

La forte concentration d'insuline, la présence d'ions Zn^{2+} , et le pH faible dans les granules entraînent la cristallisation de l'hormone. Les cristaux sont denses aux électrons, donc bien visibles en microscopie électronique à transmission. On parle alors de vésicules larges à cœur dense (Burgoyne and Morgan, 2003). Le peptide ne retrouvera sa forme soluble qu'une fois sécrété.

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 au site de libération (Donelan et al., 2002). La dépolymérisation de l'actine permet également la progression des vésicules matures vers l'exocytose (Li et al., 1994).

B / Les vésicules sécrétoires

1 - Les différents types de vésicules dans les cellules β

1.1 - Les microvésicules de type synaptiques ou (MVTs)

Les microvésicules de type synaptique (MVTs) renferment des substances de faible poids moléculaire comme le glutamate, les catécholamines ou le GABA¹ (Reetz et al., 1991). Elles ressemblent aux vésicules synaptiques contenues dans les neurones. Leur taille est beaucoup plus faible que celle des granules, en moyenne 90 nm (Braun et al., 2004). Elles portent une glycoprotéine caractéristique, la synaptophysine (Wiedenmann et al., 1986). Leur exocytose est régulée par le calcium de la même manière que les granules. Cependant, après fusion avec la membrane plasmique et libération de leur contenu, elles peuvent être réutilisées de manière totalement indépendante de l'appareil de Golgi (Mundigl et al., 1993). Elles possèdent, en effet, des transporteurs qui leur permettent de se charger à nouveau en neurotransmetteurs dans le cytoplasme (Gerber and Sudhof, 2002).

1.2 - Les granules sécrétoires ou vésicules larges à cœur dense (VLCD)

Les vésicules larges à cœur dense (VLCD), ou granules sécrétoires matures, contiennent l'insuline ainsi que de nombreux autres composés présents localement avec la pro-insuline dans l'appareil de Golgi (Hutton, 1994). Le diamètre des granules varie de 100 à 300 nm selon les auteurs (Barg et al., 2002). Ils peuvent être libérés dans le milieu extérieur de façon constitutive ou stimulée. La libération constitutive

¹ GABA : γ amino butiric acid

concerne environ 1% des granules (Bataille, 2002) et assure une exocytose constante d'insuline ainsi que le transport des lipides et protéines vers la membrane plasmique. Les oscillations calciques spontanées de la cellule β pourraient être à l'origine de cette libération dite constitutive.

La libération stimulée est déclenchée par une élévation de la concentration intracellulaire de calcium. Les mécanismes moléculaires de cette libération sont détaillés dans le paragraphe suivant.

2 - Les étapes vers la fusion

La capacité de réponse adéquate de la cellule à une stimulation dépend, entre autre, 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 étudiés par différentes techniques : biochimiques, microscopiques ou électrophysiologiques. En fonction de la méthode, les compartiments ou les étapes décrites reflètent des observations morphologiques ou fonctionnelles parfois qualifiées par le même nom, ce qui porte à confusion (figure I9).

2.1 - "Docking" ou amarrage

Les premières études morphologiques faites sur des coupes de cortex cérébral observées en microscopie électronique à transmission ont décrit un groupe de vésicules proche de la membrane plasmique, à moins de 100 nm (Gray, 1959). Ces vésicules dites morphologiquement amarrées (docked), ont été confondues avec les vésicules rapidement libérables recrutées lors de la première phase de la sécrétion d'insuline (Olofsson et al., 2002).

Les études biochimiques ont ensuite montré que le "docking" possède une signification moléculaire quelque peu différente de la signification morphologique. L'assemblage réversible du complexe SNARE (voir paragraphe C) fait partie des étapes de docking.

Toutes les vésicules morphologiquement amarrées à la membrane ne sont pas fonctionnellement amarrées. Seule une portion du groupe de vésicules à moins de 100 nm de la membrane plasmique est immédiatement libérable (Barg et al., 2002; Eliasson et al., 1997).

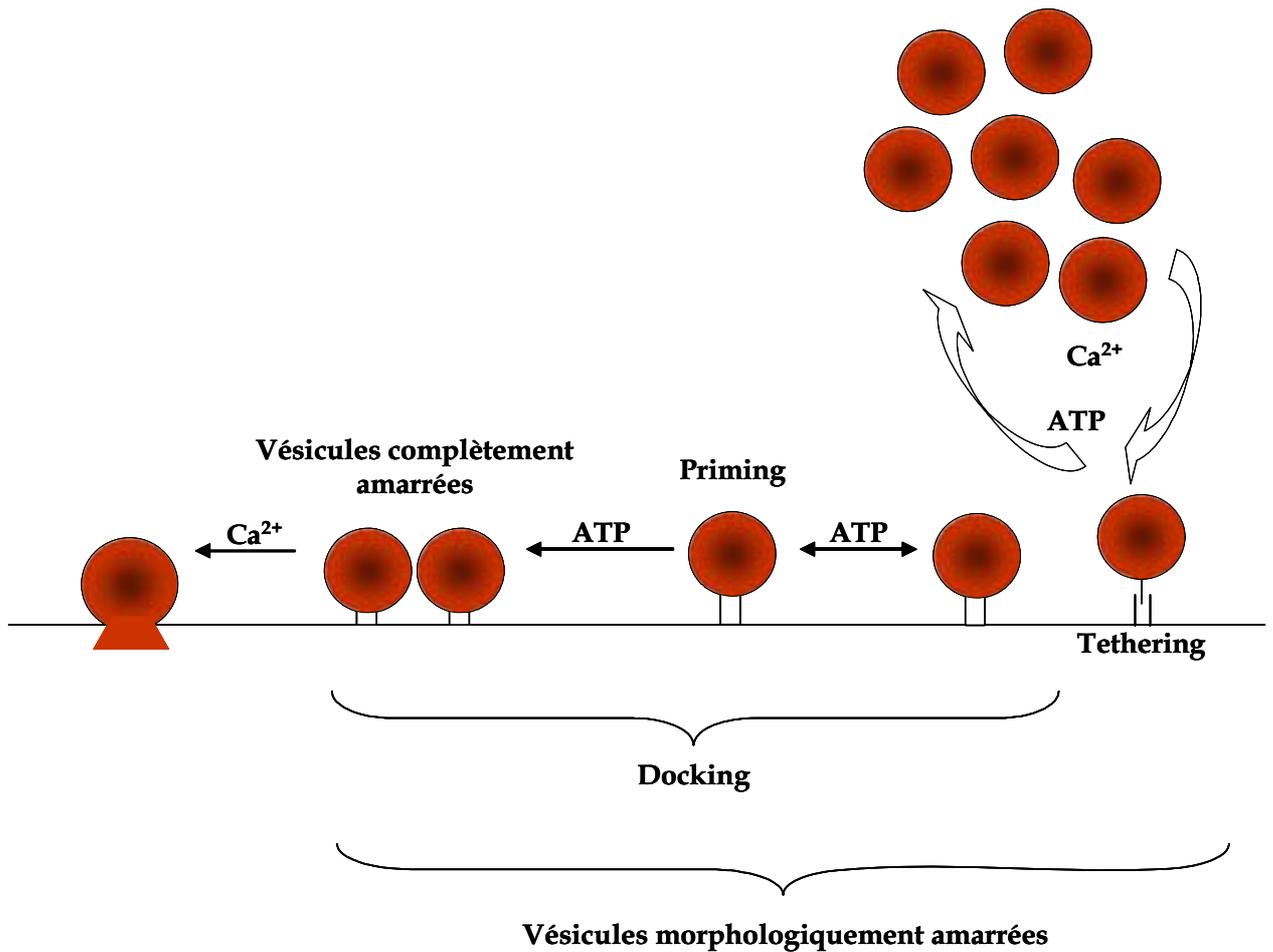


Figure I9 : Les étapes vers la fusion

Les vésicules matures du compartiment de réserve doivent franchir plusieurs étapes réversibles avant d'atteindre un stade d'association avec la membrane qui est irréversible pour lequel l'exocytose est déclenchée par un influx calcique.

L'accrochage ou "tethering" est une étape réversible de reconnaissance des partenaires. Les vésicules s'amarrent ensuite de plus en plus fermement jusqu'à atteindre un état irréversible où l'influx calcique pourra provoquer l'exocytose. Le "priming" correspond aux modifications biochimiques, dépendantes de l'ATP, qui permettent aux vésicules d'atteindre la compétence à la fusion.

2.2 - “Tethering” ou accrochage

La notion de “tethering”, ou accrochage, est venue des études des mécanismes moléculaires de la fusion membranaire dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* (pour revue voir Waters and Hughson, 2000). Ce terme recouvre les aspects biochimiques et moléculaires de la reconnaissance des membranes et de leur association. Ces étapes permettent la reconnaissance de la membrane cible par la vésicule grâce un mécanisme encore partiellement connu mais qui pourrait impliquer les Rab, petites protéines G de la famille des Ras (Schimmoller et al., 1998). Après la reconnaissance des membranes, l’amarrage proprement dit ou “docking” (différent du docking morphologique) se fait par l’assemblage réversible du complexe SNARE. Différentes réactions réversibles mènent à un état complètement amarré de la vésicule où le calcium seul pourra déclencher l’exocytose (voir figure I9).

Le terme de tethering reflète un état réversible alors que le docking aboutit à un état irréversible où les vésicules sont compétentes à la fusion.

2.3 - “Priming”

Les mécanismes cellulaires de la sécrétion d’insuline ont été décrits par des approches électrophysiologiques qui ont permis de résoudre la cinétique de la sécrétion (voir chapitre I/E/2). Les mécanismes moléculaires ont, quant à eux, été étudiés grâce aux cellules perméabilisées. Ce modèle qui permet de contrôler précisément la composition du cytosol a établi la dépendance de la sécrétion d’insuline au calcium mais aussi à l’ATP (Lang et al., 1995; Vallar et al., 1987).

Le terme de “priming” a été par la suite utilisé pour décrire l’ensemble des étapes dépendantes de l’ATP qui permettent aux vésicules d’acquérir la capacité de fusion (Burgoyne and Morgan, 2003). Ces étapes ne sont pas encore toutes connues mais elles pourraient inclure l’acidification des granules via la pompe à protons dépendante de l’ATP (Barg et al., 2001), la réorganisation du cytosquelette afin de permettre l’accès des vésicules à la membrane plasmique (Li et al., 1994) et la phosphorylation des phosphoinositides de la membrane plasmique (Eberhard et al., 1990; Lang, 1999). Ces étapes peuvent également être dépendantes du calcium comme la réorganisation du cytosquelette par exemple (Li et al., 1994).

Les vésicules sécrétoires doivent donc être transportées vers la membrane plasmique, reconnaître la membrane cible et s’y accrocher de plus en plus fermement jusqu’à atteindre un stade irréversible où la stimulation calcique pourra déclencher l’exocytose (figure I9).

3 - La fusion de la vésicule avec la membrane plasmique

3.1 - Fusion complète ou incomplète (“kiss-and-run”)

Afin de maintenir une surface cellulaire constante, un mécanisme de compensation se met en place après l’exocytose, c’est l’endocytose. Il existe une relation temporelle entre les deux phénomènes. Des mesures de capacitance sur les cellules β pancréatiques montrent une augmentation de l’endocytose suite à une stimulation de la cellule β par le glucose (Eliasson et al., 1996). Le mécanisme d’endocytose qui se met en place après la fusion complète d’une vésicule avec la membrane plasmique est dépendant de la clathrine (Maycox et al., 1992). Cependant, il est également possible pour les vésicules de ne pas complètement fusionner avec la membrane plasmique mais de créer un pore transitoire qui se referme. La vésicule est alors recyclée selon un mécanisme indépendant de la clathrine. Ce phénomène est appelé le “kiss-and-run” (Neher, 1993). Ce mécanisme rapide semble être prépondérant dans les synapses dites rapides du système nerveux central (Aravanis et al., 2003; Gandhi and Stevens, 2003). Dans le cas des granules sécrétoires, les résultats sont contradictoires. Grâce à la technique de microscopie à ondes évanescentes¹, deux groupes ont pu suivre le devenir de vésicules contenant une protéine fluorescente dans des cellules PC12 ou insulino-sécrétoires MIN6 stimulées. Dans le cas des cellules PC12, la proportion de vésicules fusionnant par “kiss-and-run” est prépondérante (Taraska et al., 2003) alors que dans le cas des MIN6, la fusion complète est majoritaire (Ma et al., 2004).

La fusion incomplète est un mécanisme rapide, adapté au recyclage des vésicules synaptiques qui peut se faire dans le cytoplasmique. Les granules sécrétoires qui

¹ Microscopie à ondes évanescentes : méthode de microscopie qui permet d’observer les événements ayant lieu jusqu’à 100 nm sous la surface membranaire. Cette technique est utilisée pour observer, sur cellules vivantes, le devenir de vésicules chargées d’une protéine chimère fluorescente lors de la stimulation de l’exocytose.

contiennent l'insuline sous une forme cristallisée doivent, pour libérer leur contenu, maintenir l'ouverture du pore de fusion suffisamment longtemps pour permettre la diffusion. Le phénomène de "kiss-and-run" semble donc incompatible avec la sécrétion d'insuline.

3.2 – Le pore de fusion : lipidique ou protéique ?

Le pore de fusion, lorsqu'il se forme, possède transitoirement une conductance comparable à celle d'un canal ionique (19 pS et 1 nm), puis se dilate lentement (Lindau and Almers, 1995). Les mécanismes biophysiques menant à la formation du pore de fusion, ou même sa constitution, ne sont pas encore clairement établis. La conductance faible observée lors de sa formation est en faveur d'une structure protéolipidique préformée. Pourtant, ces caractéristiques sont aussi compatibles avec une structure purement lipidique (Chanturiya et al., 1997).

Si le pore de fusion n'est pas uniquement constitué de lipides, quelles sont les protéines qui en forment le cœur ? Une étude de la fusion vacuolaire de la levure a montré la présence de la sous-unité V_0 de la pompe H^+ dépendante de l'ATP qui forme, par dimérisation dépendante des SNARE et de la calmoduline, un canal avec la sous-unité de la membrane cible (Peters et al., 2001). La présence de la syntaxine a également été récemment envisagée (Han et al., 2004b).

Quelque soit la constitution du pore de fusion, les bicouches se mélangent progressivement en passant par une étape transitoire où les feuillettes externes sont en contacts, c'est l'hémifusion. La déformation initiale des membranes permettant le mélange et l'hémifusion est provoquée par des protéines (Jahn et al., 2003).

La question de la présence ou non de protéines dans le pore de fusion n'est toujours pas tranchée cependant certaines protéines peuvent en réguler la cinétique d'ouverture : les complexines (Archer et al., 2002), la "cystein string protein" (CSP) (Graham and Burgoyne, 2000) ou Munc-18 (Fisher et al., 2001).

C/ Les acteurs moléculaires de la fusion membranaire

1 - Le complexe SNARE

1.1 - Mise en évidence du complexe de fusion universel

C'est le développement d'une méthode d'analyse du transport intra-golgien (inactivable par le N-ethylmaleimide NEM) qui a permis de mettre en évidence une ATPase du cytosol capable de restaurer ce transport en présence de NEM. Cette ATPase, elle-même sensible au NEM, est appelée NSF pour "N-ethylmaleimide sensitive fusion protein" (Block et al., 1988). Par la suite, les adaptateurs également cytoplasmiques de la NSF sont découverts : les SNAP pour "soluble NSF attachment protein" (Clary et al., 1990). Le complexe NSF-SNAP intervient dans le transport vésiculaire et permet la fusion des membranes, or il est composé de protéines cytosoliques. C'est Sollner et coll., en 1993, qui décrivent les récepteurs à la NSF : les SNARE pour "soluble NSF attachment protein receptor" (Sollner et al., 1993).

Parallèlement, des études génétiques sur des mutants de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, sélectionnés pour leur incapacité à sécréter à une température permissive de 37°C, ont amené à la description d'un mutant sec-1 (Novick and Schekman, 1979). La manipulation du génome de la levure va aboutir à la description de 23 mutants, sec-1 à sec-23, possédant tous au moins un défaut dans le transport ou la sécrétion des vésicules (Novick et al., 1980).

L'homologie de séquence entre toutes les protéines de levure impliquées dans les défauts de transport des mutants sec et les protéines SNARE va logiquement aboutir à la notion de complexe universel pour la fusion membranaire (Burgoyne and Morgan, 2003).

Enfin, la description par le groupe de H. Neimann, de l'effet des toxines botuliques et tétanique sur les SNARE a achevé d'établir le rôle de ces protéines comme élément majeur de l'exocytose des neuromédiateurs. La transmission synaptique est fortement inhibée en présence de toxines botuliques et tétanique dont l'effet majeur est la coupure des protéines SNARE (Link et al., 1992).

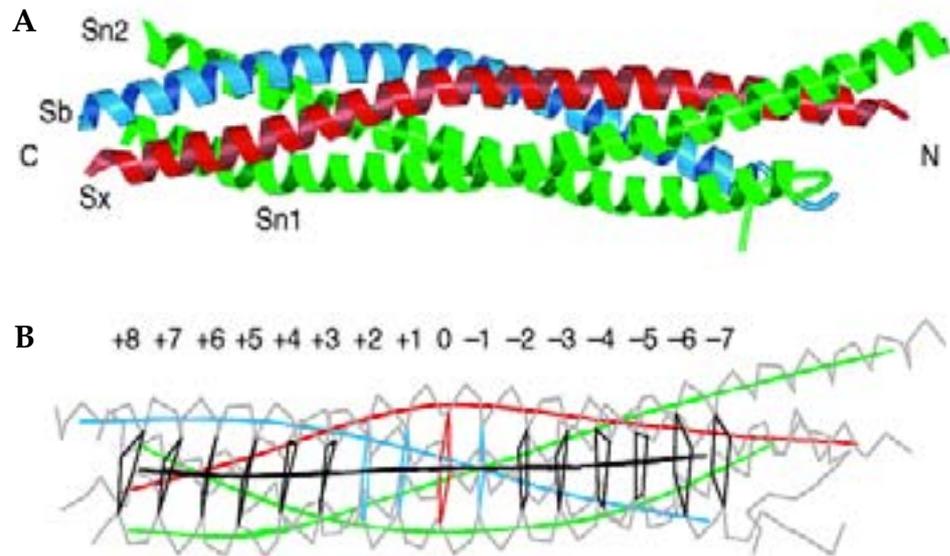


Figure I10 : Topologie et organisation du complexe SNARE

A : Schéma du squelette du complexe SNARE.

En bleu est représentée synaptobrevine-VAMP2 (Sb), en rouge la syntaxine (Sx), et en vert les deux hélices de SNAP-25 (Sn1 et Sn2). Le complexe est représenté de telle manière que les extrémités carboxy-terminales sont à gauche (C) et les extrémités amino terminales à droite (N).

B : Organisation du complexe de fusion

Les axes des quatre hélices sont indiquées, les couleurs sont les mêmes que précédemment. Au centre, l'axe de la super hélice est tracé en noir de même que les plans perpendiculaires reliant les résidus portés par les 4 hélices, représentés en gris. Les 16 couches sont notées de +8 à 0 puis de 0 à -7.

D'après Sutton, R.B., et al., *Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution*. Nature, 1998. **395**(6700): p. 347-53

1.2 - Description du complexe SNARE

Les protéines SNARE font partie d'une famille contenant 24 membres chez la levure et plus de 35 chez les mammifères (Bock et al., 2001). Les différents membres partagent un domaine commun de 60 acides aminés que l'on appelle le motif SNARE et dont la structure tridimensionnelle est une hélice α (voir figure I10). Quatre motifs SNARE peuvent s'associer de façon parallèle et former une super hélice appelée le complexe SNARE (Ernst and Brunger, 2003; Sutton et al., 1998). Lorsqu'il est formé, le complexe SNARE est très stable. Sa température de fusion est de 70°C et il est résistant à la dénaturation par un détergent fort comme le SDS. La stabilité du complexe est assurée par des liaisons électrostatiques établies entre les quatre acides aminés positionnés sur le même plan, appelée couche 0 (figure I10). Seize couches sont réparties sur une longueur de 120 Å et numérotées de -8 à 0 et de 0 à 7. Au centre de l'hélice, la couche 0 associe toujours 3 résidus Glycine (Q) et un résidu Arginine (R) (Ernst and Brunger, 2003; Sutton et al., 1998). La conservation dans tous les complexes de cette organisation a amené une classification des protéines SNARE en R ou Q-SNARE. Des mutations ciblées sur cette couche 0 ont abouti à des résultats contradictoires quant à la nécessité de la balance 3Q/1R pour la formation du complexe (Graham et al., 2001; Ossig et al., 2000; Wei et al., 2000). Cette structure, bien que conservée, ne semble pas essentielle à la formation du complexe (Graham et al., 2001).

1.3 - Les protéines SNARE et les cellules β pancréatiques

Lors de la fusion d'une vésicule d'exocytose avec la membrane plasmique, la formation du complexe implique trois molécules; deux sont présentes sur la membrane cible, ce sont les t-SNARE pour "target" SNARE. La troisième se trouve sur la membrane de la vésicule qui doit fusionner, la protéine v-SNARE. Les deux protéines t-SNARE sont la syntaxine et la SNAP-25¹.

Il existe à ce jour 5 isoformes de la syntaxine décrites dans les cellules β : Syntaxine 1, 2, 3, 4 et 6 (Lang et al., 1997c). Les syntaxine 1 et 2 sont présentes sur la membrane plasmique mais seule syntaxine 1 participe à la sécrétion d'insuline (Lang et al., 1997a).

¹ SNAP-25 : SNARE-associated protein of 25 kDa

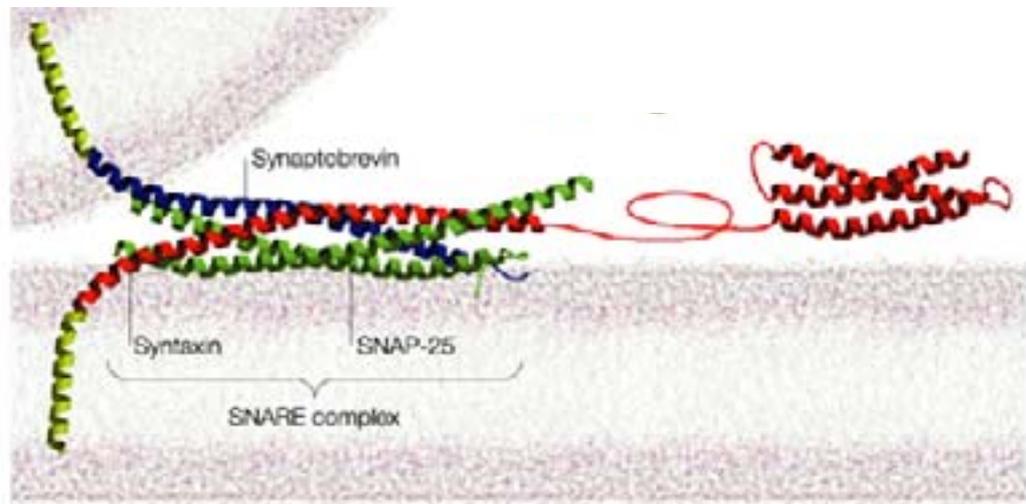


Figure I11 : Le complexe SNARE

Le complexe est formé par quatre hélices : une hélice est apportée par la vésicule et les trois autres hélices sont apportées par la membrane cible. Ce complexe très stable permet de rapprocher les membranes.

D'après Chapman, E.R., *Synaptotagmin: a Ca²⁺ sensor that triggers exocytosis?* Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. 3(7): p. 498-508

La syntaxine 6 est présente sur les vésicules immatures et la localisation des syntaxine 3 et 4 n'est pas connue.

Deux isoformes de SNAP sont connues SNAP-25 et SNAP-23, les deux sont exprimées dans les cellules β mais seule SNAP-25 participe à la sécrétion d'insuline (Jacobsson et al., 1994; Sadoul et al., 1995).

La protéine v-SNARE portée par les vésicules est appelée VAMP¹. Il existe 3 isoformes de VAMP présentes dans les cellules β pancréatiques : VAMP-2, VAMP-3 et VAMP-7 (Boyd et al., 1995; Sadoul et al., 1997; Wheeler et al., 1996). VAMP-2 et VAMP-3 sont présentes sur les VLCD et les MVTS et participent à la sécrétion d'insuline.

La fusion des VLCD avec la membrane plasmique est donc sous la dépendance de la formation du complexe SNARE formé de SNAP-25, VAMP-2 et Syntaxine 1.

1.4 – Les protéines SNARE et la fusion membranaire

Les deux protéines VAMP-2 et syntaxine 1 possèdent un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique portant une hélice α pouvant s'engager dans le complexe. SNAP-25 est ancrée à la membrane plasmique par des résidus cystéines palmitoylés et porte deux domaines cytoplasmiques en hélice α pouvant s'engager dans le complexe (Ernst and Brunger, 2003; Sutton et al., 1998).

Les trois protéines engagées dans le complexe permettent de rapprocher les membranes lors de la fusion (figure I11). La séquence d'association n'est pourtant pas clairement établie. Certains auteurs proposent que SNAP-25 et VAMP-2 s'associent préalablement à l'entrée de la syntaxine 1 (Chen et al., 2001). Au contraire, d'autres auteurs proposent l'association de VAMP-2 au complexe préformé avec SNAP-25 et la syntaxine 1 (Fiebig et al., 1999; Nicholson et al., 1998).

Quelque soit l'ordre dans lequel ces protéines s'associent, des mesures électrophysiologiques ont démontré l'existence d'un complexe lâche pour lequel les quatre hélices sont associées de façon incomplète. Entre cette première étape de contact et la fermeture de l'hélice existeraient de nombreuses étapes réversibles (Chen et al.,

¹ VAMP : vesicle associated membrane protein

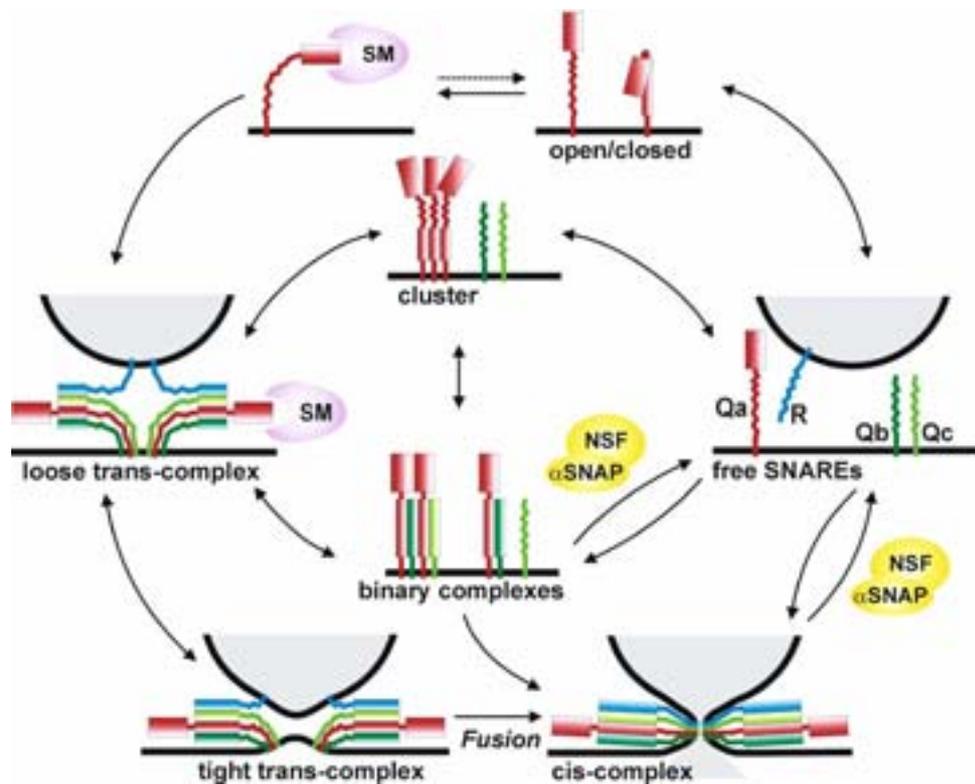


Figure I12 : Le cycle conformationnel des protéines SNARE

Les protéines SNARE portent des motifs SNARE non structurés qui interviennent dans de multiples interactions. La syntaxine oscille entre une forme ouverte ou fermée, les protéines SM (comme Munc-18) se lie à syntaxine seule ou lorsqu'elles sont engagées dans le complexe. Les protéines SNARE s'associent et forment des complexes lâches et réversibles qui se referment et rapprochent les membranes. Lorsque les protéines SNARE ne sont pas engagées dans un complexe elles sont regroupées en cluster ou en complexes binaires syntaxine-SNAP25 ou syntaxine-VAMP. Après la fusion, le complexe est dissocié par l'ATPase NSF et son adaptateur α -SNAP.

Jahn, R., T. Lang, and T.C. Sudhof, *Membrane fusion*. Cell, 2003. **112**(4): p. 519-33

2001; Graham et al., 2001) que l'on apparente au glissement d'une fermeture éclair ("zipper").

Ce complexe est capable d'induire à lui seul la fusion de liposomes reconstitués et, bien que la réaction soit beaucoup plus lente que celle qui a lieu *in vivo* (Weber et al., 1998), le complexe SNARE est aujourd'hui reconnu comme étant la machinerie minimale de la fusion membranaire (voir figure I12).

Ce mécanisme général de fusion s'applique à tous les types cellulaires, mais a été largement décrit dans les neurones. Des manipulations génétiques effectuées sur la drosophile et sur la souris ont montré l'importance des protéines SNARE dans la neurotransmission. Il est intéressant de noter que l'absence de la syntaxine est bien plus dommageable que l'absence des deux autres protéines. Par exemple la délétion du gène codant pour VAMP-2 ou SNAP-25 chez la souris entraîne l'absence de transmission synaptique évoquée mais pas de la transmission synaptique spontanée (Schoch et al., 2001). La délétion du gène codant pour la syntaxine chez la drosophile au contraire provoque l'absence totale de transmission spontanée et évoquée (Schulze et al., 1995).

Après la fusion, les molécules du complexe doivent se séparer, cette étape de dissociation est réalisée par l'ATPase NSF et un adaptateur qui peut être α -SNAP ou son homologue β -SNAP. L'homo-hexamère de NSF, recruté par α / β -SNAP, forme un cylindre au centre duquel se place le complexe SNARE. L'hydrolyse de l'ATP permet un changement de conformation qui induit le désenroulement de la super hélice (Burgoyne and Morgan, 2003). Dans cette étape, la présence du résidu glycine (Q) donné par la syntaxine au niveau de la couche 0 semble essentielle à l'étape de dissociation par le NSF (Scales et al., 2001).

2 - Les régulateurs de l'association du complexe SNARE

De nombreuses protéines sont capables de se lier au complexe SNARE, soit pour en réguler la formation soit pour le rattacher au reste des acteurs moléculaires de l'exocytose.

2.1 - La complexine

La complexine se lie à la syntaxine uniquement lorsqu'elle est engagée dans le complexe SNARE et permettrait ainsi sa stabilisation. Des études électrophysiologiques ont montré que la surexpression de la complexine dans les cellules chromaffines permettait d'allonger le temps d'ouverture du pore de fusion (Archer et al., 2002).

2.2 - Munc-18

Munc-18 est aussi un partenaire de la syntaxine. Elle est l'homologue mammifère de Sec-1, premier mutant décrit chez la levure. Cette protéine a également été décrite chez le mutant *unc-18* de *Ceanorhabditis elegans* (Graham et al., 1997). Munc-18 forme avec la syntaxine, lorsque celle-ci est dans une conformation repliée, un hétérodimère de forte affinité (Graham et al., 1997; Misura et al., 2000). Le complexe SNARE ne peut se former que si la syntaxine est dans une conformation ouverte, elle ne peut donc pas lier Munc-18 et SNAP-25 en même temps. Munc-18 pourrait donc avoir un rôle de régulation de l'entrée de la syntaxine dans le complexe SNARE. Dans des cellules β -pancréatiques clonales, les HIT-T15, l'injection de peptide Munc-18 ou d'anticorps dirigés contre Munc-18 a un effet amplificateur de la sécrétion d'insuline (Zhang et al., 2000).

2.3 - Les protéines Rab

Les protéines Rab sont des petites protéines G de la famille des Ras. Elles sont présentes sous de nombreuses formes, au moins 60 chez les mammifères et dans tous les compartiments de la cellule (Pereira-Leal and Seabra, 2000). Ces protéines ne possèdent pas de domaine transmembranaire mais peuvent s'associer aux membranes par un groupement geranyl (voir figure I13). La protéine Rab, liée au GDP est maintenue dans le cytosol par sa liaison avec un GDI (GDP dissociation inhibiteur). La protéine Rab est recrutée sur sa membrane cible par l'échange GDP/GTP et la dissociation du GDI, qui lui permet de s'associer au GEF (guanine-nucleotide exchange factor). La protéine Rab, liée au GTP peut alors s'associer à son effecteur sur une membrane différente et ainsi participer à la reconnaissance des membranes (Jahn et al., 2003).

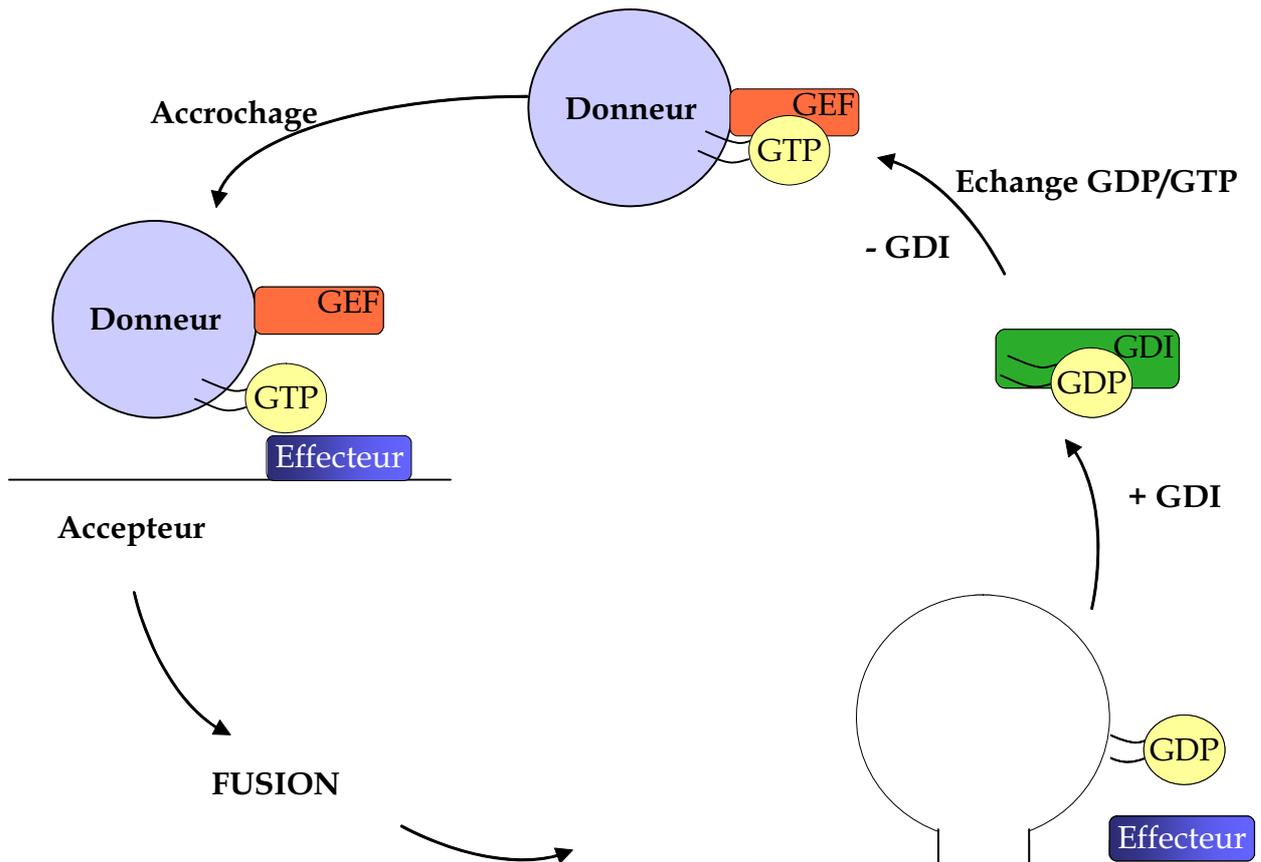


Figure I13 : Les régulateurs de l'association du complexe SNARE : le cycle des protéines Rab

Le GDI (guanine dissociation inhibitor) s'associe aux protéines Rab qui portent une molécule de GDP. Cette association dissocie les protéines Rab des membranes. Le facteur GEF (guanine nucleotide exchange factor) permet l'échange du GDP contre le GTP. La protéine Rab portant le GTP va se lier à son effecteur sur la membrane cible. La spécificité des GEF et des effecteurs pour chaque protéine Rab place ce cycle au cœur de la reconnaissance des membranes qui doivent fusionner.

D'après Jahn, R., T. Lang, and T.C. Sudhof, *Membrane fusion*. Cell, 2003. **112**(4): p. 519-33

La protéine Rab3A, présente sur les vésicules synaptiques, n'est pas essentielle dans les cellules mammifères mais elle pourrait réguler le recrutement des vésicules au niveau des zones actives dans les neurones (Geppert et al., 1994a). Les effecteurs connus de Rab3A sont RIM, rabphilin 3A et Noc2, tous impliqués dans l'exocytose des cellules insulino-sécrétoires ou des cellules chromaffines (Burgoyne and Morgan, 2003; Coppola et al., 2001).

Les quatre isoformes de Rab3 (Rab3A à D) sont impliquées dans la régulation de la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques (Iezzi et al., 1999).

Les protéines Rab ne régulent pas directement la formation du complexe SNARE. Cependant, leur capacité d'association et de dissociation cyclique des vésicules avec la membrane plasmique pourrait réguler l'accrochage des vésicules avec les membranes cibles. La présence des isoformes des Rab sur les différents compartiments ainsi que la multitude d'effecteurs possibles pour chaque isoforme en font un candidat idéal pour le rôle de reconnaissance des compartiments qui doivent fusionner (Schimmoller et al., 1998).

3 - Le calcium : facteur déclencheur de la stimulation

La concentration de calcium libre $[Ca^{2+}]_i$ dans le cytosol est maintenue à un niveau basal de $0,1 \mu M$ (Burgoyne and Morgan, 1995). Des protéines lient le calcium ainsi que des mécanismes dépendants de l'ATP permettent de maintenir dans les organelles telles que le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi ou la mitochondrie, le calcium sous une forme liée. Dans les cellules excitables, l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage déclenche une entrée du calcium du milieu extracellulaire vers le cytoplasme et donc une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$. Les nombreuses études effectuées avec des chélateurs du calcium ou des mesures biophysiques de diffusion du calcium (Yamada and Zucker, 1992) sur des neurones ont établie à environ $100 \mu M$ la $[Ca^{2+}]_i$ nécessaire à la neurotransmission.

Les études sur des cellules neuroendocrines perméabilisées, comme la lignée insulino-sécrétoire RINm5F, ont estimé la valeur de l' EC_{50} de l'exocytose à environ $2 \mu M$ de Ca^{2+} (Vallar et al., 1987). Cette différence importante entre neurones et cellules neuroendocrines était expliquée par le regroupement dans les zones présynaptiques

des canaux calciques. Dans ces zones actives, l'entrée du calcium par les nombreux canaux crée des microdomaines de forte concentration calcique. La dépendance calcique des neurones était donc adaptée à ces domaines.

Les cellules neuroendocrines étaient considérées comme moins polarisées, les vésicules sécrétoires pouvant se situer à une plus grande distance du canal, la dépendance calcique était dictée par la diffusion du calcium, estimée à 10 à 13 $\mu\text{m/s}$ (Allbritton et al., 1992; Augustine, 2001).

Les méthodes de stimulation par libération de calcium encagé¹ couplées à des mesures électrophysiologiques, ont plus récemment montré que la dépendance calcique de la libération des neurotransmetteurs se situait autour de 10 à 20 μM de calcium (Bollmann et al., 2000; Schneggenburger and Neher, 2000). Il a également été montré que les vésicules sécrétoires dans les cellules β -pancréatiques, comme les vésicules synaptiques dans les zones actives, sont rassemblées à proximité des canaux calciques (Barg et al., 2002; Bokvist et al., 1995).

La dépendance calcique de l'exocytose n'est donc pas si différente entre neurones et cellules neuroendocrines, sauf peut être pour certains systèmes très particuliers comme la synapse bipolaire de poisson rouge (Heidelberger et al., 1994).

Les méthodes fines de mesure des évènements d'exocytose dans les cellules neuroendocrines ont également montré que différentes étapes en amont ou en aval de la fusion membranaire sont sensibles au calcium. Le recrutement des vésicules à la membrane, le "priming" ou l'endocytose sont régulées, avec des affinités plus faibles, par le calcium (Burgoyne and Morgan, 2003; Heinemann et al., 1993).

De la notion de sensibilité au calcium, des étapes d'exocytose ou de transport dans les neurones ou les cellules neuroendocrines, découle la notion de senseur calcique.

¹ Calcium encagé : cette technique utilise un composé chimique lié au calcium. Le calcium ainsi encagé ne peut pas être utilisé par la cellule. Une stimulation par un flash de lumière ultraviolette libère le calcium. Cette méthode permet de s'affranchir des gradients de concentration de calcium, lorsque le flash libère le calcium, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est uniforme dans tout le cytoplasme.

4 - Les senseurs calciques

La stimulation de l'exocytose par le calcium implique la présence de molécules capables de détecter les variations de concentration calcique intracellulaire. Ces molécules senseurs, en liant le calcium, déclenchent la fusion membranaire.

Les études des mécanismes cellulaires dépendants du calcium sont conventionnellement réalisées grâce à l'utilisation de chélateurs tels que le BAPTA¹ ou l'EGTA². C'est l'effet différent de ces deux molécules qui a permis de mettre en évidence différents senseurs calciques. L'EGTA possède une vitesse d'association avec le calcium de l'ordre de $2,5 \times 10^6 \text{ m}^{-1}\text{s}^{-1}$ alors que le BAPTA s'associe plus rapidement à une vitesse de $4 \times 10^8 \text{ m}^{-1}\text{s}^{-1}$. Le premier est couramment utilisé pour mettre en évidence l'effet de gradient de calcium alors que le second révèle des augmentations transitoires de la $[\text{Ca}^{2+}]$.

Il existe à ce jour deux molécules décrites comme senseurs calciques du transport ou de l'exocytose dans les cellules sécrétoires et plus particulièrement dans les neurones : les synaptotagmines et la calmoduline.

La calmoduline possède une vitesse d'association au calcium comparable à celle du BAPTA et a été impliquée par ce biais dans le transport intra-golgien et endosomal régulé par le calcium (Colombo et al., 1997). Parce que cette protéine est le senseur calcique de la fusion vacuolaire chez la levure (Peters and Mayer, 1998), un rôle identique dans l'exocytose des vésicules synaptiques a été envisagé. Cependant la vitesse de dissociation du calcium sur la calmoduline est très lente, ceci permet le maintien de la protéine sous sa forme activée alors même que la concentration calcique est revenue à un niveau basal. Cette caractéristique est en défaveur d'une fonction de senseur calcique dans un processus aussi rapide que la fusion des vésicules synaptiques (Burgoyne and Clague, 2003). La calmoduline est sans doute impliquée dans des étapes plus précoces de recrutement des vésicules synaptiques. L'activation de la CamKinase II par la calmoduline permet la phosphorylation de la synapsine et induit la libération des vésicules bloquées par le cytosquelette (Hilfiker et al., 1999;

¹ BAPTA : (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N'-tetraacetic acid

² EGTA : Acide éthylène glycol-bis(β -aminoéthyléther) N, N, N', N'-tétraacétique

Mohlig et al., 1997). D'autre part, la liaison de la calmoduline à VAMP2, en changeant sa conformation, permettrait de préparer les vésicules à la fusion (De Haro et al., 2004).

Le meilleur candidat au rôle de senseur calcique de l'exocytose des neurotransmetteurs est aujourd'hui la synaptotagmine (Syt). Les Syt forment une famille de protéines dont l'isoforme Syt 1 a été tout d'abord nommée p65 relativement à son poids apparent, et décrit comme un constituant majoritaire des vésicules synaptiques (Matthew et al., 1981). Depuis, de nombreuses études biochimiques, génétiques et fonctionnelles ont cherché à démontrer son rôle comme senseur calcique de l'exocytose. Ces études essentiellement réalisées sur les cellules neuronales ont permis d'établir que l'isoforme Syt 1 est bien le senseur calcique de la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique dans les neurones (Koh and Bellen, 2003).

III / LES SYNAPTOTAGMINES

Les synaptotagmines (Syt) forment une famille de protéines de seize membres identifiés à ce jour. Elles partagent toutes une structure commune comportant deux domaines C2, homologues au domaine régulateur C2 de la PKC, reliés par une zone variable à un domaine transmembranaire unique. L'isoforme la mieux décrite au sein de la famille des synaptotagmines est la Syt 1, et par analogie la Syt 2 qui lui est très homologue. La Syt 1 a été très largement étudiée, c'est une protéine portée par les vésicules synaptiques, la structure tridimensionnelle de ses domaines C2 est résolue et de nombreux partenaires ont été décrits *in vitro*. De nombreuses études fonctionnelles et biochimiques ont démontré que Syt 1 jouait le rôle de senseur calcique de l'exocytose des neuromédiateurs. Cependant, les localisations des autres isoformes ne sont pas encore connues, encore moins leurs fonctions (pour revue voir Marqueze et al., 2000). Ce chapitre permettra de regrouper les connaissances sur les Syt. Leur structure, leurs partenaires protéiques et la fonction de Syt 1 seront détaillés puis les connaissances sur les autres isoformes seront à leur tour développées.

A / Structure de Syt 1

La Syt 1 de souris est une protéine de 421 acides aminés, décrite pour la première fois par Matthew et coll. comme un constituant majeur des vésicules synaptiques (Matthew et al., 1981). Elle possède un domaine amino-terminal intra vésiculaire d'une soixantaine d'acides aminés et un domaine transmembranaire unique que les programmes de prédiction de structure (<http://www.ch.embnet.org>, sosui@proteom.bio.tuat.ac.jp) estiment à 21 acides aminés. Le domaine transmembranaire est séparé du premier domaine C2 par un domaine de liaison de 160 acides aminés très variable dans la famille des Syt, en séquence comme en longueur. Cette zone variable, les deux domaines C2A et C2B, ainsi que l'extrémité carboxy-terminale constituent la zone cytoplasmique de la protéine (figure I14).

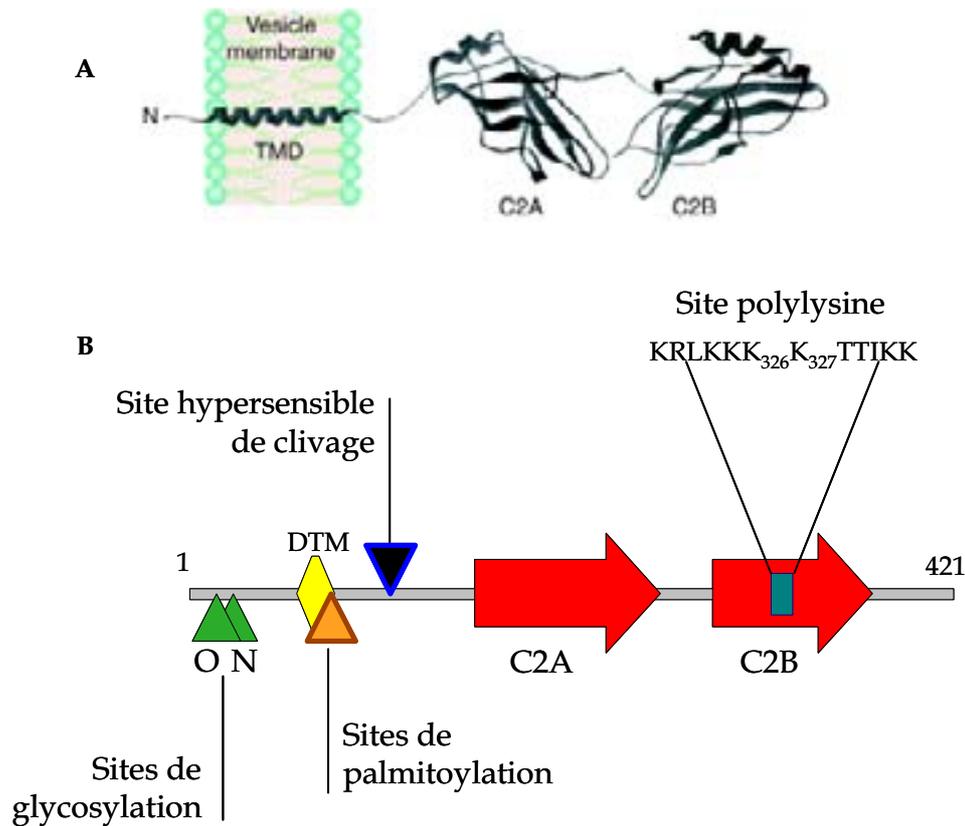


Figure I14 : Structure de la synaptotagmine 1

A : La synaptotagmine 1 est portée par la vésicule synaptique. Le court domaine amino terminal est intravésiculaire alors que la majeure partie de la molécule est située dans le cytoplasme.

B : La Syt 1 possède un domaine amino terminal portant un site de O-glycosylation et un site de N-glycosylation.

Cinq résidus cystéine au niveau de la jonction entre le domaine transmembranaire (DTM) et la zone cytoplasmique sont des sites de palmitoylation. Le domaine de liaison entre le DTM et le premier domaine C2 possède un site de clivage hypersensible.

1 - Les différents domaines de Syt 1

La région intra vésiculaire amino-terminale porte des sites de glycosylation. Les deux résidus thréonine en position 15 et 16 sont le site d'une O-glycosylation (Fukuda, 2002b; Perin et al., 1991). Le résidu asparagine en position 24 est un site de N-glycosylation (Perin et al., 1991; Sugita et al., 2001). La présence du résidu N-glycosylé en position 24 serait responsable de la localisation de Syt 1 sur les vésicules synaptiques (Han et al., 2004a).

A la jonction entre le domaine transmembranaire et le domaine de liaison, se trouvent 5 résidus cystéines : deux sont contenus dans le domaine transmembranaire prédit, trois dans le domaine cytoplasmique. Ces résidus cystéines sont des sites potentiels de palmitoylation et de liaison avec d'autres protéines par des ponts disulfures. Parmi les cinq résidus cystéine qui peuvent potentiellement être palmitoylés (Heindel et al., 2003), ceux contenus dans le domaine transmembranaire engageraient plutôt des liaisons avec d'autres Syt. Cette oligomérisation est indépendante du calcium (Fukuda and Mikoshiba, 2000a; von Poser et al., 2000). Ainsi, les résidus du domaine de liaison, seraient palmitoylés et pourraient donc lier les phospholipides (Chapman et al., 1996).

Le domaine de liaison porte un site de phosphorylation par la caséine kinase II (Davletov et al., 1993), cependant cette phosphorylation n'a jamais été montrée comme ayant un effet fonctionnel.

Au centre de ce domaine de liaison, au niveau des résidus 111 et 112, existe un site très exposé de coupure par la trypsine qui rend cette protéine très sensible à la dégradation. Cette caractéristique est souvent utilisée pour obtenir des fragments cytoplasmiques de la protéine native (Perin et al., 1991).

La description des domaines C2, caractéristiques des Syt, fait l'objet d'un paragraphe particulier (page suivante). Enfin, le domaine carboxy-terminal, qui fait suite au second domaine C2, a été impliqué dans la liaison à la neurexine 1 α et à la calmoduline (Perin, 1994; Perin, 1996).

2 - Les domaines C2

Les domaines C2 constituent la plus grande partie de la zone carboxy-terminale de la protéine, leur structure tridimensionnelle est caractérisée par 8 feuillets β reliés les uns aux autres par des boucles (Sutton et al., 1995). Les feuillets β s'organisent de façon antiparallèle le long d'un axe de 50 Å, quatre feuillets faisant face aux quatre autres (Ubach et al., 1998). Au "sommet" des domaines C2, tels qu'il sont couramment représentés (figure I15), deux des trois boucles reliant les feuillets β portent des résidus aspartate qui, grâce à leurs charges négatives, sont capables de lier des ions calcium (Shao et al., 1998). Les études de cristallographie effectuées à des concentrations salines assez élevées proposent un modèle de liaison de 5 ions calcium sur les boucles. Selon ce modèle, sur le domaine C2A, trois ions calcium se lient sur une zone n'excédant pas 6 Å. Sur le domaine C2B, qui partage pourtant la même structure que le domaine C2A, ne se fixent que deux ions calcium (Fernandez et al., 2001).

Les domaines C2 de la Syt 1 portent les fonctions majeures de cette protéine ; la liaison aux phospholipides et aux protéines t-SNARE, syntaxine 1 et SNAP-25, de façon dépendante du calcium.

B/ Les interactions fonctionnelles de Syt 1

1 - La liaison de Syt 1 aux phospholipides anioniques

1.1 - La liaison aux phospholipides dépendante du calcium

La liaison de Syt 1 avec les phospholipides anioniques a été mise en évidence par des études *in vitro* de sédimentation. Le fragment cytosolique de Syt 1, isolé à partir de la protéine native coupée par la trypsine, sédimente avec les vésicules synaptiques en présence de 3 μ M de calcium (Chapman and Jahn, 1994).

De nombreuses études ont également montré que la protéine chimère, composée du domaine C2A de Syt 1 couplée à la glutathione-S-transférase (GST-Syt 1 C2A), est capable de lier les liposomes radioactifs, en présence de calcium, lorsqu'ils sont composés d'au moins 25% de phosphatidyl sérine (PS) (Chapman and Davis, 1998;

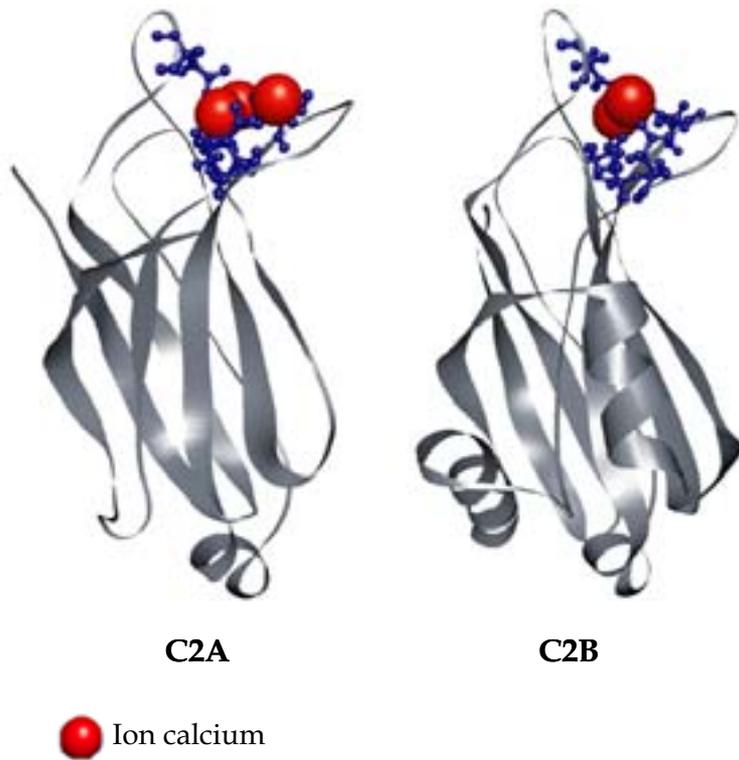


Figure I15 : La liaison des ions calcium sur les domaines C2 : un modèle

Modélisation des domaines C2 montrant la présence des 8 feuillets β reliés par des boucles. Au sommet de la molécule, la première et la troisième boucle portent cinq résidus aspartate sur lesquels peuvent se fixer les ions calcium. A droite, les domaines C2 sont représentés par une vue plongeante au sommet des domaines.

D'après : Chapman, E. R. (2002). Synaptotagmin: a Ca^{2+} sensor that triggers exocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, p498-508.

Davletov and Sudhof, 1993; Mikoshiba et al., 1995; Robinson et al., 2002; Wang et al., 2003). La liaison se fait avec une EC_{50} de $5 \mu\text{M}$ (Davletov and Sudhof, 1993). La présence de phospholipides chargés négativement est indispensable car aucune liaison n'est observée avec des liposomes reconstitués ne contenant que de la phosphatidyl choline (PC) (Davletov and Sudhof, 1993).

Le domaine C2B possède une structure similaire au domaine C2A pourtant les études *in vitro* concernant la capacité de la protéine recombinante GST-Syt 1 C2B à lier les phospholipides en présence de calcium ont donné des résultats contradictoires en fonction du type d'expérience. Le domaine C2B seul, dans le contexte de la protéine recombinante GST-Syt 1 C2B, ne semble pas être capable (Earles et al., 2001; Wu et al., 2003), ou très peu (Fernandez-Chacon et al., 2002), de lier *in vitro* les liposomes portant des phospholipides anioniques. Pourtant, la même protéine recombinante possède la propriété de co-sédimer avec les mêmes liposomes (Fernandez et al., 2001; Shin et al., 2003; Sugita et al., 2002). Ces résultats, apparemment contradictoires, reflètent un comportement différent de la protéine en conditions *in vitro* ou *in vivo*. La liaison du C2B aux phospholipides nécessite son oligomérisation préalable qui ne peut pas se faire *in vitro* (voir chapitre 5.3). La coopération existant entre les deux répétitions du domaine C2 dans la protéine native, qui a été récemment établie *in vivo* (Robinson et al., 2002), est également mise en jeu dans cette liaison.

1.2 - Mécanisme de liaison du calcium sur les boucles des domaines C2

La liaison du calcium sur le domaine C2A ne provoque pas un changement conformationnel de Syt 1, comme cela a été proposé (Davletov and Sudhof, 1994; Garcia et al., 2000) mais un changement de potentiel électrostatique de surface (Zhang et al., 1998). Ce mécanisme diffère de celui décrit pour la PKC qui lie des phospholipides neutres en changeant de conformation (Nalefski et al., 2001).

Les boucles du domaine C2A, à pH physiologique, portent cinq résidus aspartate chargés négativement ce qui procure à la molécule un potentiel électrostatique de surface globalement négatif. Les ions calcium portant des charges positives peuvent donc s'y lier (figure I16). Parce que la coordination des ions calcium n'est pas complète avec les cinq résidus aspartate, le potentiel électrostatique de surface de la molécule

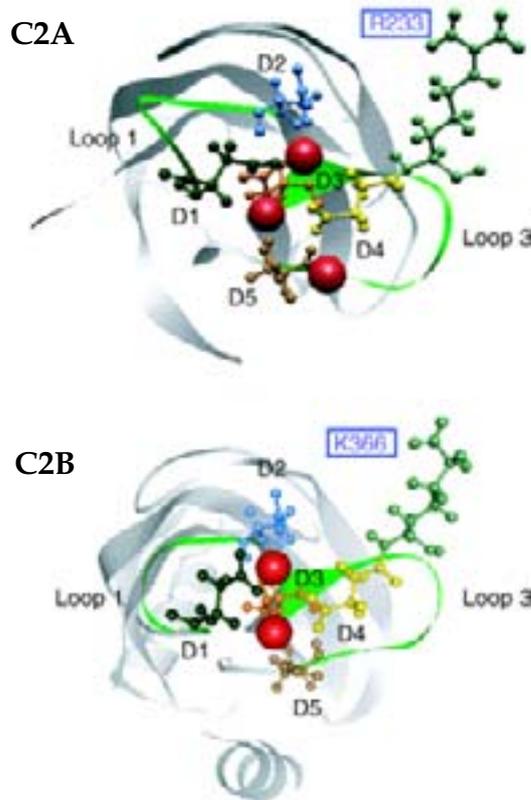


Figure I16 : Mécanisme de liaison des ions calcium sur les boucles des domaines C2

Les domaines C2 sont représentés en vue plongeante. Les ions calcium (modélisés en rouge) sont liés par des interactions électrostatiques aux résidus aspartates (D). Deux résidus chargés positivement R233 et K366 sont présents à proximité des boucles.

D'après : J. Bai and E. Chapman, *The C2 domains of synaptotagmin partners in exocytosis*. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 2004 29 (3) : p 143-151.

devient positif (Murray and Honig, 2002; Zhang et al., 1998). La neutralisation de ce potentiel peut alors être achevée par la liaison aux phospholipides anioniques. Les trois composants, Syt 1, le calcium et les phospholipides sont donc nécessaires à la stabilité des liaisons. Ceci explique l'augmentation importante, jusqu'à 1000 fois, de l'affinité intrinsèque de Syt 1 (Kd) pour le calcium en présence de phospholipides anioniques (Zhang et al., 1998). En effet, l'affinité intrinsèque du domaine C2A pour le calcium qui, en solution, est de 1 mM passe à des valeurs de l'ordre de 5 à 25 μ M (en fonction de la composition des liposomes reconstitués) en présence de phospholipides anioniques (Gerber et al., 2001; Nalefski et al., 2001).

1.3 - Liaison aux phospholipides par les résidus hydrophobes

La liaison portée par les résidus aspartate en présence de calcium n'est pas la seule à s'établir entre Syt 1 et la membrane plasmique (figure I17). Quatre résidus hydrophobes ; la méthionine en position 173, la phénylalanine en position 234, la valine en position 304 et l'isoleucine en position 367 peuvent pénétrer la bicouche (Fernandez-Chacon et al., 2002) sur une profondeur d'environ 5 Å (Frazier et al., 2003). Des liaisons électrostatiques entre des résidus chargés positivement et les phospholipides anioniques sont également envisageables. Entre les deux domaines C2, se trouvent deux résidus lysine, en position 233 et 366 : R233 et K366, qui pourraient établir ce type de lien entre Syt 1 et la membrane (Wang et al., 2003).

1.4 - La liaison aux phospholipides indépendante du calcium

En dehors de toute présence de calcium, le domaine C2B de Syt 1 est capable de s'associer aux phosphoinositol (4,5) diphosphate (PIP₂) (Schiavo et al., 1996). Les PIP₂ sont les précurseurs de l'IP₃¹ et du DAG², ils ne sont présents que dans les membranes plasmiques (Micheva et al., 2001) et pourraient ainsi recruter les protéines de la machinerie exocytotique.

L'injection de PIP₂ dans les cellules PC12 perméabilisées est suffisante pour déclencher l'exocytose sans que l'on sache précisément le mécanisme moléculaire

¹ IP₃ : Inositol 3 Phosphate

² DAG : Diacylglycérol

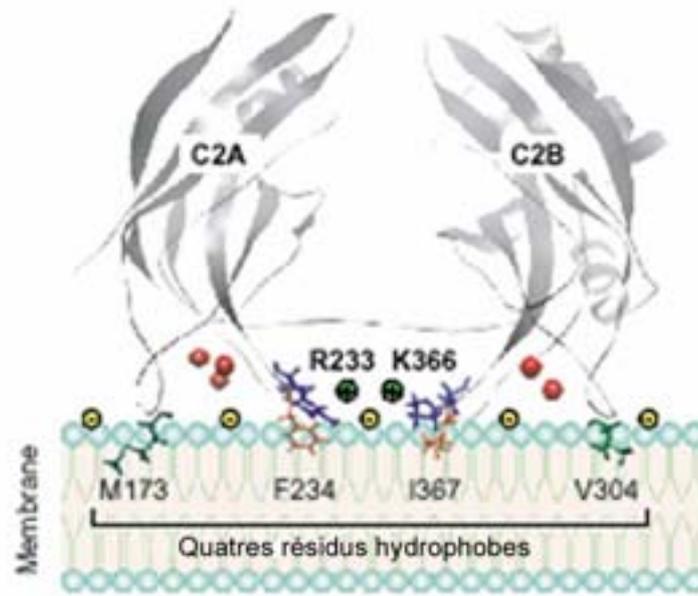


Figure I17 : Mode d'insertion de la Syt 1 dans la bicouche lipidique

La liaison des ions calcium augmente l'affinité de Syt 1 pour la bicouche phospholipidique. Quatre résidus hydrophobes peuvent s'insérer dans les membranes et participer à la liaison. Cette configuration permet aux résidus R233 et K366 de lier SNAP-25 par des liaisons électrostatiques.

D'après : J. Bai and E. Chapman, *The C2 domains of synaptotagmin partners in exocytosis*. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 2004 29 (3) : p 143-151.

impliqué (Eberhard et al., 1990). Une étude récente montre que le domaine C2B de Syt 1, dans le contexte d'une protéine chimère recombinante composée de la GST et du seul domaine C2B, est capable de lier les liposomes portant au moins 1% de PIP₂ (Bai et al., 2004a). A contrario, le domaine C2A n'est pas capable de s'associer aux mêmes liposomes reconstitués. La liaison du domaine C2B aux PIP₂ a lieu même en l'absence de calcium et est abolie par la mutation de deux résidus lysine en position 326 et 327 (K326 et K327) (Bai et al., 2004a). Le modèle ainsi proposé (figure I18) implique une reconnaissance entre le domaine C2B, par les résidus K326 et K327, et les PIP₂ permettant de "positionner" la Syt 1 spécifiquement au niveau de la membrane plasmique puis, lorsque les ions calcium se fixent, les boucles s'insèrent dans la bicouche par liaison avec les phospholipides anioniques et pénétration des résidus hydrophobes.

Cette liaison, entre Syt 1 et un composant spécifique 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. Se fait-elle avec les phospholipides de la membrane plasmique, c'est à dire en *trans*, ou de la vésicule même, c'est à dire en *cis*? Lorsque la Syt 1, portée par des liposomes, est mise en présence de liposomes de même composition (25% PS/75% PC), la membrane sur laquelle elle s'associe préférentiellement en présence de calcium est la membrane de la vésicule qui est la plus proche (Bai et al., 2000). Cette liaison peut simplement être expliquée par la plus grande probabilité de rencontre en *cis* qu'en *trans* mais elle révèle 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 des mécanismes de reconnaissance existent et l'attachement de Syt 1 aux PIP₂, phospholipides spécifiques des membranes plasmiques, est un bon candidat.

2 - La liaison de Syt 1 aux protéines du complexe SNARE

L'immunoprécipitation de Syt 1 avec les neurexines à partir des vésicules synaptiques (Perin, 1994) a été un des premiers arguments permettant de relier cette protéine à la machinerie exocytotique.

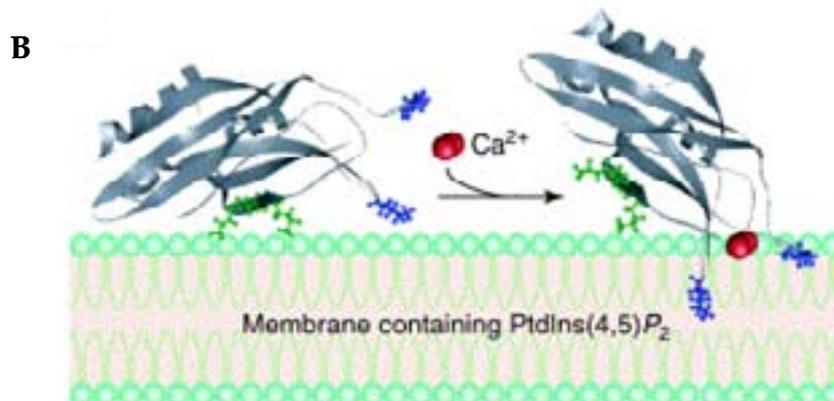


Figure I18 : Mode d'insertion de la Syt 1 dans la bicouche lipidique

Le domaine C2B de Syt 1 est capable de lier le phosphatidyl-inositol (4,5) Phosphate (PtdIns(4,5)P₂) en absence de calcium. Cette liaison permettrait l'association de Syt 1 avec les membranes préalablement à la stimulation. La liaison du calcium provoquerait alors le basculement de la protéine et l'insertion dans les membranes.

D'après : J. Bai and E. Chapman, *The C2 domains of synaptotagmin partners in exocytosis*. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 2004 29 (3) : p 143-151.

2.1 - Liaison de Syt 1 à la syntaxine 1

Le rôle central de Syt 1 dans la fusion des vésicules synaptiques a été confirmé par la description *in vitro* de la liaison de Syt 1 au complexe SNARE (Chapman et al., 1995). Le domaine cytoplasmique de Syt 1 (Syt 1 C2AB) se lie à la syntaxine de manière dépendante du calcium (Chapman et al., 1995; Earles et al., 2001; Wang et al., 2003). Cette liaison a été mise en évidence par des méthodes de “pull-down”¹ en présence de la syntaxine fusionnée à la GST (GST-Synx) et de la protéine recombinante Syt 1 C2AB (Chapman et al., 1995; Earles et al., 2001; Wang et al., 2003) ou de GST-Synx et des extraits d’homogénats de cerveau (Chapman et al., 1995). Cette technique a permis de mettre en évidence une liaison de Syt 1 C2AB avec la syntaxine même en absence de calcium mais cette liaison est fortement augmentée en présence de 1 mM de calcium libre. Les domaines impliqués dans cette interaction seraient la partie carboxy-terminale de la syntaxine, proche de la membrane cible (acides aminés 241 à 266) et de le domaine C2A de Syt 1 (Kee and Scheller, 1996).

2.2 - Liaison de Syt 1 à SNAP-25

Par la même technique, la liaison de Syt 1 C2AB avec SNAP-25 a aussi été décrite (Gerona et al., 2000). Cette liaison existe en absence de calcium mais elle est fortement augmentée en présence de 1 mM de calcium.

Cependant d’autres études, sans remettre en cause la liaison de Syt 1 avec les SNARE, décrivent une association qui ne pourrait se faire qu’en présence des trois protagonistes Syt, Syntaxine et SNAP-25 (Bai et al., 2004b; Gerona et al., 2000; Rickman et al., 2004a). La question n’est pas strictement tranchée, et l’explication des divergences réside sans doute dans le type d’expérimentation. La présence de la GST semble en effet augmenter la capacité de liaison de Syt 1 avec les protéines SNARE (Tucker et al., 2003). Pourtant si la fonction de Syt 1 est de faire le lien entre stimulation calcique et exocytose, il est probable que la liaison se fasse avec le complexe SNARE formé par l’une, l’autre ou les deux t-SNARE.

¹ Pull-down : Méthode biochimique permettant la mise en évidence d’interactions protéiques. Une protéine recombinante fusionnée à la GST est fixée sur des billes par son extrémité GST. Les billes permettent de sédimenter spécifiquement les complexes protéiques formés en présence de la protéine recombinante.

2.3 - Liaison de Syt 1 à VAMP-2

Aucune liaison directe n'a été démontrée entre Syt 1 et VAMP. Lorsque le complexe SNARE est immunoprécipité avec un anticorps dirigé contre la Syntaxine 1 ou SNAP-25, les deux protéines Syt 1 et VAMP sont présentes dans ce complexe (Gerona et al., 2000). L'interaction entre Syt 1 et VAMP-2 est donc indirecte.

Quelles que soient les équipes, les résultats concernant l'importance de chacun des domaines C2 concordent. Qu'il s'agisse de la liaison à la syntaxine (Li et al., 1995), à SNAP-25 (Gerona et al., 2000), ou au dimère Syntaxine-SNAP-25 (Tucker et al., 2003), la protéine recombinante contenant les deux répétitions du domaine C2 se lie mieux aux protéines SNARE que les protéines recombinantes ne possédant que le domaine C2A ou le domaine C2B.

2.4 - Modèles d'interaction entre Syt 1 et le complexe SNARE

Deux modèles de liaison de Syt 1 au complexe SNARE ont été récemment étudiés. Les deux études impliquent la liaison de Syt 1 avec SNAP-25 grâce à des liaisons électrostatiques mais les résidus engagés dans l'interaction ne sont pas les mêmes.

La première hypothèse propose la liaison des deux résidus chargés positivement R233 et K366 (voir figure I17), sur le domaine C2A et C2B respectivement, et situés à proximité des résidus liant les ions calcium (Wang et al., 2003). La liaison de la protéine recombinante Syt 1 C2AB avec SNAP-25 est diminuée de 50% lorsque l'un des deux, ou les deux résidus sont mutés en glutamine. La surexpression de Syt 1 possédant l'une, l'autre ou les deux mutations dans les PC12, diminue également le taux de sécrétion des catécholamines mesuré par ampérométrie.

Les mêmes mutations n'influencent aucunement la liaison à la syntaxine mais diminuent la force ionique nécessaire pour décrocher Syt1 C2AB des liposomes contenant des phospholipides anioniques. Selon les auteurs, Syt 1 engagerait donc des liaisons électrostatiques avec SNAP-25 et les phospholipides anioniques de la membrane plasmique par ces deux résidus R233 et K366. L'effet fonctionnel de Syt 1 sur l'exocytose impliquerait en partie cette interaction. L'allongement de la boucle de

connexion entre les deux domaines C2 diminue de façon proportionnelle la liaison au complexe SNARE et la sécrétion de catécholamines (Wang et al., 2003).

Le deuxième modèle d'interaction entre Syt 1 et SNAP-25 met également en jeu des liaisons électrostatiques qui concernent le quatrième feuillet β du domaine C2B. Cette zone comporte une région fortement chargée contenant 7 résidus lysines sur 12 acides aminés. Cette séquence protéique est très conservée puisqu'on la retrouve sur tous les homologues de Syt 1 de la levure à l'Homme (Rickman et al., 2004a). Certains de ces résidus lysine (K326, K327), ont été impliqués dans la liaison au PIP₂ (voir paragraphe 1.4), dans la liaison à d'autres protéines mais aussi dans l'oligomérisation de Syt 1 indépendante du calcium (voir paragraphe 5.3). La mutation des deux résidus K326 et K327 en glutamine suffit à diminuer de 80% la liaison de la protéine recombinante Syt 1 C2AB avec le dimère SNAP-25/Syntaxine. Les auteurs proposent l'existence d'une liaison électrostatique entre les résidus lysines K326 et K327 du domaine C2B et le complexe SNARE. La liaison concernerait les quatre résidus aspartate, chargés négativement, présents à la surface exposée de SNAP-25, lorsqu'elle est engagée dans le complexe SNARE (Rickman et al., 2004a). La liaison des protéines recombinantes SNAP-25 et Syt 1 est d'ailleurs inhibée par la mutation des résidus aspartates en position 179 et 186 ou 179 et 193 de SNAP-25 (Zhang et al., 2002a). Pourtant, une autre étude récente a montré que la mutation des deux résidus lysine n'inhibe pas totalement la liaison entre Syt 1 et SNAP-25 mais en diminue l'affinité (Bai et al., 2004b).

3 - Liaison de Syt 1 aux canaux calciques dépendants du voltage

3.1 - L'interaction entre les canaux calciques et Syt 1

Les canaux calciques dépendants du voltage sont constitués de quatre répétitions d'une sous-unité $\alpha 1$, formant le canal à proprement parlé, auxquelles sont associées une sous-unité β , une sous-unité $\alpha 2/\delta$. Les canaux des muscles squelettiques possèdent également une sous-unité supplémentaire, la sous-unité γ . Le type de sous-unité $\alpha 1$ constituant le canal permet de classer les récepteurs en différentes familles. Il existe des canaux de type N, P/Q, R, T ou L. Parmi les canaux de type L, les canaux Lc sont majoritairement exprimés dans les cellules β pancréatiques (Fisher and Bourque, 2001). Leur canal est formé de la sous-unité $\alpha 1.2$ contenant quatre domaines I à IV, chacun

composé de six domaines transmembranaires. Les différents domaines sont reliés entre eux par des boucles cytoplasmiques capables d'engager des liaisons protéiques.

La liaison de Syt 1 avec les canaux calciques dépendants du voltage de type N a été démontrée dans les vésicules synaptiques par co-immunoprécipitation. L'analyse des protéines immunopurifiées avec le canal a révélé la présence de Syt 1 (Leveque et al., 1994).

Par la suite, les études de co-immunoprécipitation, associées à une étude de liaison *in vitro* avec des protéines recombinantes, ont montré l'interaction directe entre Syt 1 et les canaux de type P/Q a également été mise en évidence (Charvin et al., 1997).

Enfin, plus récemment la liaison *in vitro* entre les canaux de type Lc et Syt 1 a également été démontrée (Wiser et al., 1999). La liaison s'établit entre la boucle cytoplasmique reliant le deuxième et le troisième domaine de la sous unité $\alpha 1.2$, appelé "synprint", et le domaine C2B de Syt 1 (Wiser et al., 1999).

3.2 - Rôle physiologique de l'interaction entre canaux calciques et Syt 1

L'interaction entre les canaux de type Lc et la Syt 1 n'a pas été strictement démontrée *in vivo*. Cependant, la présence du peptide correspondant au synprint dans les cellules β pancréatiques de souris inhibe l'augmentation de capacitance stimulée par une dépolarisation membranaire (Wiser et al., 1999). Le complexe SNARE, par la syntaxine et la SNAP-25, est également capable de lier le canal Lc (Wiser et al., 1999). La formation d'un large complexe regroupant l'ensemble des acteurs de la fusion membranaire autour du site d'entrée du calcium dans la cellule représente un modèle intéressant permettant d'expliquer le faible délai entre stimulation et fusion (0,2 à 0,5 ms).

Mais le regroupement physique autour des sites de liaison ne semble pas être le seul rôle de la liaison entre les canaux calciques dépendants du voltage et le complexe SNARE. La syntaxine 1A, par sa liaison au canal de type Lc est capable de diminuer l'amplitude du courant des ions Ba^{2+} stimulé par une dépolarisation unique (Cohen et al., 2003). La syntaxine est donc également capable de réguler le canal. Cette diminution de l'amplitude du courant traversant est contrée à 50% par la présence de Syt 1. Syt 1 semble donc agir sur la régulation par la syntaxine de la fonction du canal calcique. La mutation de quatre résidus lysine du domaine C2A de Syt 1 (K189 à K192)

en arginine inhibe complètement la capacité de Syt 1 à contrer l'effet de la syntaxine (Cohen et al., 2003).

La liaison entre le canal de type Lc et les acteurs de l'exocytose se fait donc grâce à la boucle entre le domaine II et le domaine III du canal, la syntaxine et le domaine C2A de Syt 1. Ainsi un nombre évalué à 50 granules (Barg et al., 2002) d'insuline serait à une distance de moins de 10 nm du site d'entrée du calcium dans la cellule. Ce groupe de vésicules formerait le stock de vésicules immédiatement libérables dans les cellules β pancréatiques. La libération de leur contenu serait responsable de la première phase de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose.

4 - La liaison à la neurexine et à la calmoduline

Les sites de liaison à la neurexine et à la calmoduline sont portés par l'extrémité carboxy-terminale de Syt 1. La fonction de la liaison entre les deux senseurs calciques, Syt 1 et calmoduline, n'est pas connue. La liaison de Syt 1 aux neurexines a été en revanche plus étudiée.

Les neurexines constituent une famille de récepteurs à un seul domaine transmembranaire, dont le ligand naturel serait la neurexophiline. La neurexine 1 α a cependant été isolée grâce à sa capacité à lier la toxine du venin de la veuve noire, l' α -latrotoxine, et déclencher une exocytose massive (Petrenko, 1993). Les récepteurs de l' α -latrotoxine sont essentiellement situés au niveau présynaptique, concentrés dans les zones actives de libération des neuromédiateurs. L'association de Syt 1 aux neurexines a été un indice de l'implication de cette protéine dans la libération des neuromédiateurs. De plus, l'injection du peptide correspondant aux 21 derniers acides aminés de la Syt 1 de souris dans la zone présynaptique d'un neurone géant de calmar provoque une diminution des potentiels post-synaptiques. Elle est également responsable d'une diminution du nombre de vésicules synaptiques à moins de 100 nm de la membrane plasmique. L'extrémité carboxy-terminale pourrait donc être responsable de la localisation de Syt 1 au niveau des zones actives par sa liaison aux neurexines (Fukuda et al., 2000d).

Pourtant, il a été montré plus récemment que la zone carboxy-terminale est essentielle au repliement correct du domaine C2B (Fukuda et al., 2001d). Les résultats obtenus par certaines équipes qui ont utilisé, pour étudier le rôle de ce domaine, une

protéine tronquée doivent donc être interprétées avec prudence (Fukuda et al., 2000a; Perin, 1994). Ces études pourraient bien ne refléter qu'un effet du mauvais repliement de la protéine.

5 - Le domaine C2B de Syt 1 : domaine de liaison spécifique ?

Plusieurs liaisons spécifiques au domaine C2B ont été décrites pour Syt 1, liaison à l'adaptine AP-2 (Zhang et al., 1994), à β -SNAP (Schiavo et al., 1995) et l'oligomérisation dépendante du calcium.

5.1 - Liaison à l'adaptine AP-2

Les adaptines sont impliquées dans la formation des vésicules d'endocytose de la voie dépendante de la clathrine. Syt 1, par sa liaison à AP-2, trouverait là un nouveau rôle dans la fusion et le recyclage des vésicules synaptiques. L'injection d'anticorps dirigés contre le domaine C2B provoque une diminution lente des potentiels post-synaptiques, mesurés dans la synapse géante de calmar. Cette diminution pourrait refléter une inhibition du recyclage des vésicules (Mizutani et al., 1997). Les acides aminés impliqués dans cette liaison seraient les deux résidus lysines K326 et K327.

5.2 - Liaison à β -SNAP

Syt 1 est également capable de lier *in vitro* spécifiquement β -SNAP, et pas son homologue α -SNAP par son domaine C2B (Schiavo et al., 1995). Le rôle fonctionnel de cette liaison n'est pas clairement défini.

Il apparaît pourtant que β -SNAP et Syt 1 entrent en compétition pour leur liaison avec la syntaxine (Sollner et al., 1993). Après la fusion, la Syt 1 libèrerait la syntaxine pour permettre l'association de β -SNAP au complexe SNARE. La dissociation du complexe permet ainsi le recyclage des vésicules.

5.3 - L'oligomérisation dépendante du calcium

L'oligomérisation de Syt 1 dépendante du calcium a été décrite par des méthodes de co-immunoprécipitation (Osborne et al., 1999) et de liaison covalente *in vivo* sur des vésicules synaptiques (Fukuda et al., 2001e). Dans ces deux types d'étude, qui mettent

en évidence des liaisons qui ont lieu *in vivo*, Syt 1 native est révélée sous forme d'oligomère de haut poids moléculaire.

D'autres études *in vitro*, de liaison directe entre protéines recombinantes en présence ou non de calcium, ont donné des résultats contradictoires (Chapman and Davis, 1998; Garcia et al., 2000). La dimérisation de Syt 1 par le domaine C2B en présence de calcium n'est pas toujours retrouvée.

Ces résultats divergents ont amené le groupe de T. Südhof à analyser en détail la capacité du domaine C2B à provoquer l'oligomérisation des Syt de façon dépendante du calcium (Ubach et al., 2001). Ils ont ainsi démontré que, lors de la purification des protéines recombinantes produites par la bactérie, les résidus lysine (K326 et K327) sont associés à des contaminants bactériens de type acides nucléiques. Les liaisons spécifiques du domaine C2B, au niveau de cette zone polylysine, ont donc été remises en cause, et notamment la capacité d'oligomérisation *in vitro* de Syt 1.

La capacité d'oligomérisation des protéines recombinantes en solution, après élimination des contaminants bactériens, ne semble pas être réelle (Ubach et al., 2001). Pourtant, cette capacité d'oligomérisation de Syt 1 *in vivo* a été redémontrée (Ubach et al., 2001) et ne peut avoir lieu qu'après la liaison aux phospholipides. La mutation des deux résidus lysines K326 et K327 en arginine inhibe la formation de complexes en présence de liposomes reconstitués (Wu et al., 2003). Ceci implique une réalité fonctionnelle de l'oligomérisation de Syt 1 par le domaine C2B, en présence de calcium et de phospholipides.

Les liaisons électrostatiques engagées par ces deux résidus lysines ont été impliquées dans de nombreuses liaisons (AP-2, SNARE, Syt, IP4, PIP₂). Ces interactions n'ont pas toutes été réévaluées depuis la mise en évidence des contaminants bactériens. Même si la liaison à AP-2 et β -SNAP est possible, seules les liaisons au complexe syntaxine/SNAP-25, aux phospholipides anioniques et aux autres Syt ont été confirmées.

C/ Syt 1 : Senseur calcique de la transmission synaptique

La Syt 1, protéine portée par les vésicules synaptiques, est capable de lier simultanément les phospholipides et les protéines t-SNARE de manière dépendante du calcium. Ces caractéristiques biochimiques ont fait de Syt 1 un bon candidat au rôle de senseur calcique de l'exocytose des neuromédiateurs. Depuis une dizaine d'années, les études fonctionnelles ou biochimiques ont essayé de démontrer ce rôle central de Syt 1 essentiellement dans les neurones mais aussi dans les cellules endocrines.

1 - Les études génétiques et le rôle Syt 1 dans la transmission synaptique synchrone

Une vingtaine de mutations dans le gène unique codant pour Syt 1 (DiAntonio et al., 1993a) de *Drosophila melanogaster* ont été réalisées. L'ensemble de ces mutations, qu'elles impliquent le promoteur ou l'insertion d'un codon stop dans le gène, entraînent une perturbation de la neurotransmission (DiAntonio and Schwarz, 1994; Littleton et al., 1993). En fonction de la mutation, les mouches sont soit incapables d'éclore soit, lorsque l'éclosion est provoquée manuellement, sont incapables, pour celles qui survivent, de mouvements coordonnés des membres, de la cage thoracique ou de l'abdomen.

La délétion du gène codant pour Syt 1 chez le nématode *Caenorhabditis elegans* provoque un dysfonctionnement de la synapse cholinergique, se traduisant par des problèmes de locomotion, d'alimentation et de défécation (Nonet et al., 1993).

L'étude de la transmission synaptique sur les neurones d'hippocampe de souris *null* mutantes pour Syt 1 fait aussi apparaître un défaut de la libération des neurotransmetteurs stimulée par le calcium (Geppert et al., 1994b).

Pourtant ces différentes études ont amené les auteurs à des conclusions différentes quant au rôle de Syt 1. Le débat est venu de la description d'une transmission synaptique spontanée et asynchrone maintenue (Geppert et al., 1994b), voire augmentée, chez les différents mutants créés avec la drosophile (Littleton et al., 1993; Reist et al., 1998). Chez le nématode Syt 1^{-/-}, un certain degré de transmission synaptique a également été mis en évidence par la sensibilité de la synapse aux

agonistes cholinergiques (Nonet et al., 1993). La persistance de la transmission synaptique spontanée qui existe en dehors de toute stimulation calcique a amené certains auteurs à considérer que Syt 1 n'était pas essentielle pour la libération des neurotransmetteurs (DiAntonio and Schwarz, 1994; Nonet et al., 1993). A contrario, parce que la transmission synchrone était abolie ou fortement diminuée, d'autres auteurs ont considéré que Syt 1 était le senseur calcique de l'exocytose (Geppert et al., 1994b; Littleton et al., 1993).

2 - Les études fonctionnelles cellulaires et le rôle de Syt 1 dans l'exocytose

Parallèlement aux études génétiques, la fonction de Syt 1 dans la transmission synaptique a été étudiée dans des modèles cellulaires.

Dans la synapse géante de calmar, la présence de peptide correspondant à la séquence cytoplasmique de Syt 1 inhibe la sécrétion des neurotransmetteurs. Pour permettre la sécrétion, Syt 1 doit donc être engagée dans un complexe protéique qui est dissocié par la présence du peptide (Bommert et al., 1993).

Ce même type d'inhibition est retrouvé dans les cellules PC12 (Earles et al., 2001; Elferink et al., 1993), ou les cellules insulino-sécrétoires INS-1E ou HIT-T15 (Lang et al., 1997a). La présence d'un anticorps dirigé contre les domaines C2 de Syt 1 a pour effet de masquer le domaine fonctionnel de la protéine et donc, comme avec le peptide, empêcher la formation du complexe Syt 1-effecteurs.

Par ces expériences, le rôle essentiel de Syt 1 dans l'exocytose stimulée par le calcium, a été démontré dans la synapse géante de calmar comme dans les cellules neuro-endocrines (Bommert et al., 1993; Elferink et al., 1993; Lang et al., 1997a).

Plus récemment, des mesures ampérométriques sur les cellules PC12 perméabilisées ont non seulement confirmé l'effet inhibiteur de l'injection du peptide Syt 1C2AB, mais ont aussi démontré que la liaison Syt-t-SNARE était importante pour permettre la sécrétion stimulée (Earles et al., 2001; Tucker et al., 2003). Dans les cellules PC12 la surexpression d'un mutant de SNAP-25 incapable de lier Syt 1 (par la mutation des résidus aspartates 179 et 186) entraîne une perte de la fonction de sécrétion régulée par le calcium (Zhang et al., 2002b). De même, l'allongement de la séquence entre les deux

domaines C2, provoque un défaut de liaison de Syt 1 au complexe SNARE. Cette observation, faite *in vitro*, est corrélée à la diminution de l'amplitude de la sécrétion des catécholamines stimulée par le calcium dans les cellules PC12 surexprimant cette protéine mutée (Bai et al., 2004b).

L'ensemble de ces études démontre le rôle essentiel de l'interaction entre Syt 1 et ses partenaires protéiques dans la régulation de la sécrétion stimulée par le calcium.

3 - Les études biochimiques établissant Syt 1 comme senseur calcique de l'exocytose

En dehors de la description de la liaison de Syt 1 avec les phospholipides anioniques et le complexe SNARE (Tucker et al., 2004), développée au chapitre précédent, les études *in vitro* se sont attachées à montrer la corrélation entre la cinétique de liaison de Syt 1 avec ses effecteurs et la cinétique de la sécrétion stimulée par le calcium. Cependant, cette corrélation est difficile à mettre en évidence du fait de la grande variabilité des valeurs de dépendance calcique mesurée en fonction du type de synapse ou du type de cellule endocrine (Bollmann et al., 2000; Heidelberger et al., 1994; Schneggenburger and Neher, 2000; Vallar et al., 1987). L'affinité de Syt 1 pour le calcium, évaluée par liaison *in vitro* de la protéine recombinante à des liposomes constitués d'au moins 25% de PS ou par des mesures de transfert de fluorescence (FRET)¹ est d'environ 50 μ M ce qui est tout à fait compatible avec les valeurs de dépendance calcique de l'exocytose (Bai et al., 2002; Davis et al., 1999; Nalefski et al., 2001). De plus, la constante de dissociation pour l'interaction entre Syt 1 et les phospholipides est de l'ordre du nanomolaire (Bai et al., 2002) ce qui place cette liaison parmi les plus affines des interactions répertoriées (Chapman, 2002).

L'ensemble de ces données à la fois fonctionnelles et biochimiques, a démontré l'importance de Syt 1 comme senseur calcique de la libération synchrone des neuromédiateurs ainsi que la nécessité d'une interaction entre Syt 1 et le complexe

¹ FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) : Les résidus tryptophane (Trp) possèdent la capacité de fluorescence naturelle. Lorsque les résidus Trp s'insèrent dans une bicouche lipidique composées de lipides dansylés, la fluorescence diminue par transfert aux lipides accepteurs. L'ajout de Trp sur les boucles des domaines C2 permet de suivre l'insertion des domaines dans la bicouche et en mesurer la cinétique (Bai et al., 2000)

SNARE pour avoir une exocytose stimulée. Enfin, ces études ont établi une corrélation entre les caractéristiques cinétiques de la liaison *in vivo* et les caractéristiques biochimiques de la liaison entre Syt 1 et les phospholipides. Syt 1 est donc aujourd'hui considérée comme le senseur calcique de la transmission synaptique synchrone (Koh and Bellen, 2003).

4- Modèle d'action de Syt 1

Bien qu'il soit établi que Syt 1 est le senseur calcique de la transmission synaptique synchrone, son mode d'action n'est pas clairement connu. D'après la description des différentes liaisons qui viennent d'être décrites, un modèle est envisageable (figure I19).

La liaison de Syt 1, par les résidus K326 et K327, avec les PIP₂ de la membrane plasmique de façon indépendante du calcium permettrait de positionner la vésicule à proximité de la membrane plasmique. La liaison entre les résidus K189 et K192 du domaine C2A et la boucle liant le deuxième et le troisième domaine du canal calcique permettrait également de "concentrer" les vésicules autour du site d'entrée du calcium. Avant toute stimulation, Syt 1 lie le complexe SNARE, qui se trouve dans une configuration "lâche". L'entrée du calcium provoquerait d'une part la fermeture du complexe SNARE (Littleton et al., 2001) mais également la pénétration des boucles des domaines C2 dans la membrane plasmique. On peut alors penser que le rapprochement des deux membranes plasmique et vésiculaire, permettrait la fusion. La constitution du pore de fusion n'est pas connue cependant Syt 1 pourrait en stabiliser la formation (Bai et al., 2004a; Wang et al., 2001). La présence de dimères de Syt 1 *in vivo* (Wu et al., 2003), formés après la liaison aux membranes, pourrait également permettre de créer un anneau de complexes SNARE autour du pore de fusion.

5 - Les autres fonctions possibles de Syt 1

Les études génétiques ont montré une augmentation de la transmission synaptique asynchrone chez les drosophiles, les nématodes ou les souris pour lesquels le gène de Syt 1 était délété (DiAntonio et al., 1993b; Littleton et al., 1993; Nonet et al., 1993). Ces

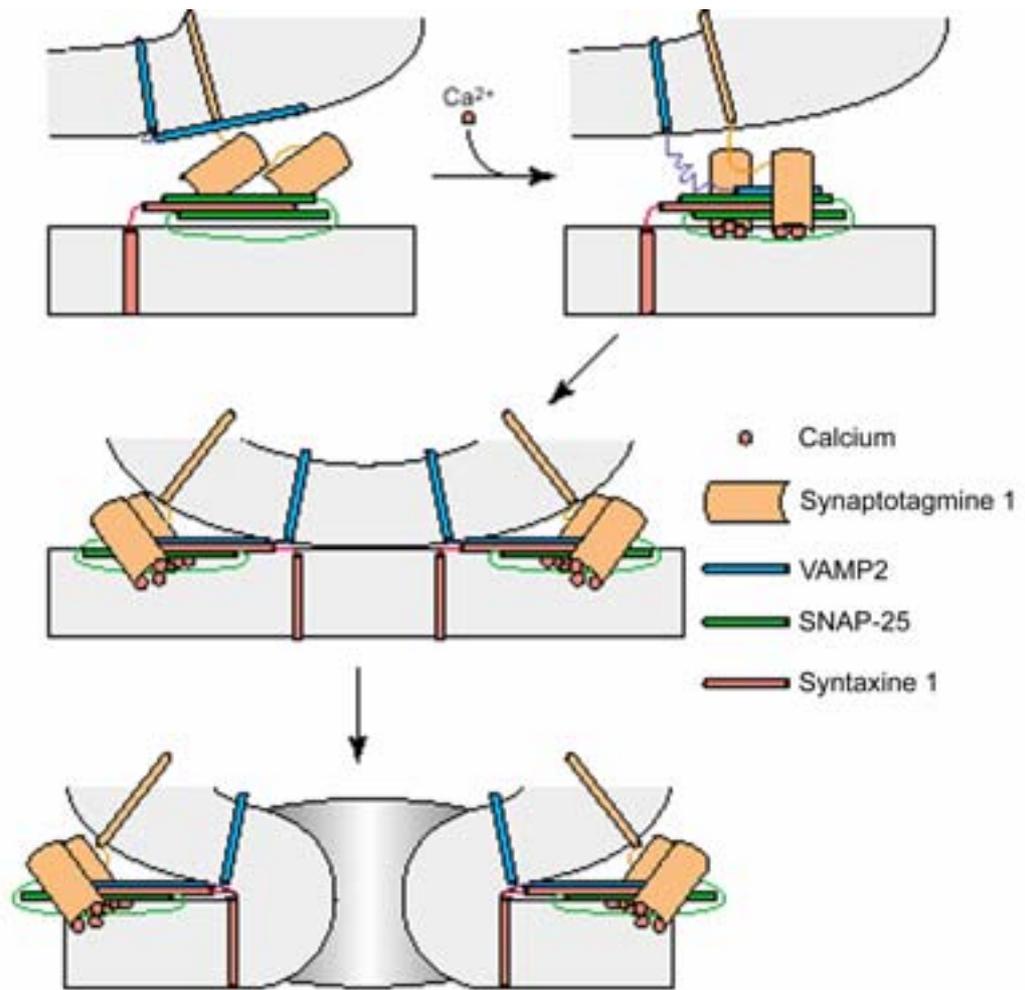


Figure I19 : Modèle d'action de Syt 1

La synaptotagmine 1 est liée, en absence de calcium, au complexe SNARE et aux membranes. Lorsque la concentration de calcium intracellulaire augmente, la liaison des ions calcium aux domaines C2 active la fermeture du complexe SNARE et l'insertion de Syt1 dans les membranes. Cette modification de structure permet le rapprochement des membranes et la fusion.

observations ont incité les auteurs à penser que la fonction de Syt 1 résidait aussi dans d'autres étapes que la sécrétion stimulée par le calcium. De plus, un variant clonal de la lignée clonale de cellules PC12, déficientes en Syt 1, est capable de libérer normalement les catécholamines en réponse à une augmentation de calcium (Shoji-Kasai et al., 1992).

Une mutation partielle du gène codant pour Syt 1 chez la drosophile entraîne une diminution du nombre d'évènements synaptiques enregistrés au niveau d'une plaque motrice. La transmission synaptique peut cependant être maintenue et les auteurs observent dans ce cas une diminution du nombre d'évènements au fil du temps (DiAntonio and Schwarz, 1994). Cette diminution est interprétée comme un défaut de recyclage des vésicules synaptiques. Cette observation a été confirmée par des études en microscopie électronique sur le nématode *C. elegans* Syt 1^{-/-}. (Jorgensen et al., 1995). Syt 1 pourrait donc jouer un rôle dans le recyclage des vésicules après la fusion. Sa capacité à lier β -SNAP et pas α -SNAP (Schiavo et al., 1995) en fait un bon candidat au rôle de régulateur spécifique de la dissociation du complexe SNARE par NSF, sans que l'on connaisse la réelle signification physiologique de cette interaction (Sollner et al., 1993).

La régulation de l'endocytose par la voie dépendante de la clathrine est aussi envisageable si la liaison à l'adaptateur de la clathrine AP-2 (Mizutani et al., 1997) s'avère avoir une réalité physiologique.

D / Les Synaptotagmines : une grande famille de protéines

1 - La famille des Synaptotagmines

1.1 - Analyse génétique de la famille

Les synaptotagmines sont une famille de protéines présentes sous de nombreuses isoformes chez les eucaryotes supérieurs (Craxton, 2004). L'absence de Syt dans les organismes pluricellulaires simples, comme les champignons, peut laisser penser que cette protéine est apparue avec le système nerveux, mais la présence d'homologues dans le règne végétal terrestre, ainsi que la découverte très récente d'une protéine portant deux domaines C2, la tricalbin, chez la levure (Schulz and Creutz, 2004) est plutôt en faveur d'un rôle général dans le transport cellulaire (Craxton, 2001).

Seize isoformes, Syt 1 à Syt 16, ont été à ce jour décrites chez l'homme et la souris (Craxton, 2004), 15 chez le rat (Fukuda, 2003b). L'homologie entre les isoformes réside essentiellement dans les domaines C2.

La structure génomique de la famille des Syt varie en fonction des isoformes (Figure I20). L'analyse *in silico* de la position des exons et des introns permet de différencier plusieurs groupes parmi les isoformes. 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, 2000c). Le gène de Syt 7, en revanche, possède une structure bien plus complexe avec 14 exons. Les isoformes possédant le nombre d'exons le plus faible sont Syt 4 et Syt 11, qui n'en contiennent que 4 (Sudhof, 2002).

Il existe pourtant quelques caractéristiques communes à l'ensemble des isoformes. Quelque soit la Syt, le domaine transmembranaire est toujours codé par le deuxième exon (Fukuda and Mikoshiba, 2000c). De plus, un exon commun est conservé dans la famille, il code pour la partie amino-terminale du domaine C2B (Craxton and Goedert, 1999) et constitue une signature de la famille.

La présence de variants d'épissage, qui peuvent être multiples pour chaque isoforme, augmente encore la complexité de régulation de l'expression de ces protéines (Craxton and Goedert, 1999). Des variants ont été décrits pour Syt 1, Syt 6 ou Syt 7 au niveau protéique (Fukuda et al., 2002c ; Sugita et al., 2001). L'épissage alternatif a été décrit au niveau de deux domaines de la protéine : le domaine transmembranaire (pour Syt 6 et Syt 7) ou le domaine de liaison (pour Syt 1 et Syt 7). Une analyse *in silico* à partir de la structure génomique, associées à l'analyse des transcrits, prédisent également la présence de variants d'épissage pour Syt 4 (Craxton and Goedert, 1999), ou Syt 15 (Fukuda, 2003b). La totalité des gènes codant pour les synaptotagmines n'a peut être pas encore été identifiée dans tous les organismes. De même, l'ensemble des variants d'épissage possibles pour chaque isoforme reste à décrire.

1.2 - Classification des différentes isoformes

Les isoformes peuvent être regroupées en familles, ou classes, qui varient en fonction du critère choisi : l'homologie des séquences protéiques des domaines C2AB (Rickman et al., 2004b), la position et le nombre des jonctions introns/exons sur le gène

(Sudhof, 2002) ou la similitude des séquences peptidiques de l'ensemble de la protéine. Grâce à ce dernier type de comparaison, représenté par un arbre phylogénique (Figure I20), quatre familles se dessinent. Une première est composée de Syt 1, Syt 2 et Syt 9, une deuxième qui englobe Syt 3, Syt 5, Syt 6 et Syt 10, une troisième est constituée de Syt 4 et Syt 11 (Fukuda et al., 1999b) et enfin une dernière regroupe les dernières isoformes clonées Syt 12, Syt 13, Syt 14, Syt 15. La Syt 12 a été une des premières isoformes identifiées à ne posséder que très peu d'homologie avec la Syt 1. L'analyse de sa séquence montrait la présence de deux domaines C2 et d'un segment transmembranaire unique. Cette isoforme a été appelée Srg1, pour synaptotagmin related gene 1 (Thompson, 1996). Il existe aujourd'hui plusieurs isoformes de ce type et la nomenclature Syt 12 est aujourd'hui conservée.

En marge de ces quatre groupes, les deux isoformes Syt 7, qui d'un point de vue protéique est assez proche de Syt 4 et Syt 11, et Syt 8 assez proche de Syt 1, sont généralement considérées de façon individuelle. Ce classement différent repose également sur des caractéristiques biochimiques particulières de ces deux isoformes (voir paragraphe 2.4 et 2.5) (Rickman et al., 2004b).

2 - Les caractéristiques biochimiques des différentes isoformes de la synaptotagmine

2.1 - Syt 1, Syt 2 et Syt 9

La partie B de ce chapitre décrit en détail les caractéristiques biochimiques de liaison aux phospholipides et aux protéines SNARE de la synaptotagmine 1. La Syt 2 possède des affinités comparables à celle de Syt 1 pour les phospholipides et les protéines SNARE (Fukuda et al., 2002b; Li et al., 1995; Rickman et al., 2004b; Sudhof, 2002). Les caractéristiques biochimiques de la liaison aux phospholipides du domaine C2A et Syt 9 sont comparables à celles de Syt 1 (Li et al., 1995). Toutefois, une étude récente montre que le comportement des domaines C2 de ces deux isoformes diffère car le domaine C2B de Syt 9 n'est pas capable de lier les phospholipides de manière dépendante du calcium (Shin et al., 2004).

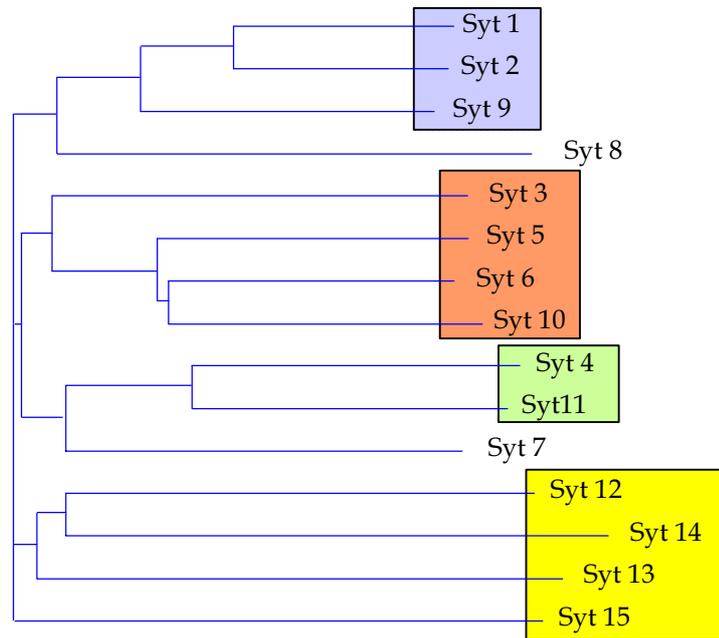


Figure I20 : Arbre phylogénique de la famille des synaptotagmines

Alignement multiple des séquences protéiques des isoformes de la famille des synaptotagmines de souris. L'alignement est réalisé grâce à l'algorithme CLUSTALW qui aligne les séquences deux à deux successivement.

On peut voir apparaître les différentes sous-familles regroupées dans des cadres de couleur. Syt 7 et Syt 8 ne font partie d'aucune sous-famille et sont considérées comme uniques.

2.2 - Syt 3, Syt 5, Syt 6 et Syt 10

La seconde sous-famille (Syt 3, 5, 6 et 10) regroupe des isoformes capables de lier les phospholipides de manière dépendante du calcium (Rickman et al., 2004b), les valeurs mesurées de l' EC_{50} de la liaison concernant le domaine C2A sont de l'ordre de 2 à 8 μM (Li et al., 1995). La liaison aux protéines SNARE a été testée pour Syt 3 et la valeur de l' EC_{50} est inférieure à 10 μM (Li et al., 1995) mais cette caractéristique ne semble pas partagée par tous les membres de la classe car Syt 6 ne lie pas les protéines SNARE de façon dépendante du calcium (Li et al., 1995). Ces isoformes partagent toutefois une incapacité à lier l'IP4 ce qui constitue une caractéristique de la classe (Ibata et al., 1998). Elles possèdent également trois résidus cystéine sur leur domaine amino terminal qui leur confère une capacité d'oligomérisation indépendante du calcium entre les membres de la sous-famille (Fukuda et al., 1999b).

2.3 - Syt 4 et Syt 11

Les isoformes Syt 4 et Syt 11 possèdent une substitution dans la séquence nucléotidique qui est spécifique de leur groupe. Un résidu sérine remplace le troisième aspartate impliqué dans la coordination du calcium sur le domaine C2A. Le domaine C2B de Syt 4 possède les 5 résidus aspartates, ce qui n'est pas le cas de Syt 11. Les caractéristiques biochimiques de ces deux isoformes sont donc différentes.

Les conclusions divergent pourtant quant à la capacité de Syt 4 à lier les phospholipides. La première étude de comparaison des affinités pour les phospholipides des domaines C2A a montré une absence de liaison de Syt 4 C2A aux liposomes (Li et al., 1995). L'affinité de Syt 4 pour les phospholipides semble toutefois dépendre de la composition et de l'agencement des lipides constituant les liposomes (Fukuda et al., 1996). Ces isoformes sont tout de même capables de lier faiblement les protéines SNARE en absence de calcium (Von Poser et al., 1997). La seconde caractéristique de cette classe d'isoforme est la séquence de leur domaine amino-terminal qui est très différente des autres isoformes (Von Poser et al., 1997).

2.4 - Syt 7

La Syt 7 est capable de lier les phospholipides avec une forte affinité, la valeur de l' EC_{50} pour cette liaison est de 1,5 μM pour le domaine C2A et 2,5 μM pour le domaine

C2B (Sugita et al., 2002). De même la liaison à la syntaxine se fait avec une forte affinité ($EC_{50} < 10 \mu M$) (Li et al., 1995; Sugita et al., 2002), mais sa caractéristique principale est sa capacité d'oligomérisation dépendante du calcium qu'elle ne partage avec aucune autre isoforme (Fukuda and Mikoshiba, 2001b).

2.5 - Syt 8 et Syt 12 à Syt 16

La Syt 8, comme les membres du dernier groupe (Syt 12 à 16), ne possède pas la capacité de lier les phospholipides ou les protéines SNARE de manière dépendante du calcium (Li et al., 1995; Rickman et al., 2004a). Ces isoformes n'ont en effet pas l'ensemble des résidus aspartates permettant la coordination du calcium (Craxton, 2004; Fukuda, 2003b; Fukuda, 2003d; Fukuda and Mikoshiba, 2001a). Les isoformes les plus récentes n'ont pas encore fait l'objet d'études biochimiques approfondies.

3 - Distribution tissulaire, localisation et fonction connues des isoformes de la synaptotagmine

3.1 - Syt 1, Syt 2 et Syt 9

Les isoformes Syt 1 et Syt 2 sont majoritairement exprimées dans le cerveau (Li et al., 1995). La distribution de Syt 1 est généralement complémentaire de Syt 2 (Marqueze et al., 1995; Ullrich and Sudhof, 1995), bien que ces deux isoformes puissent être localisées dans les mêmes neurones dans certaines zones du cerveau (Marqueze et al., 1995). Dans les neurones, Syt 1 et Syt 2 sont localisées sur les vésicules synaptiques où elles jouent le rôle de senseur calcique (Koh and Bellen, 2003). Même si la fonction de Syt 9 dans les neurones n'est pas démontrée, sa présence sur les vésicules synaptiques a été décrite (Hudson and Birnbaum, 1995).

Un rôle de senseur calcique de l'exocytose est également envisagé pour Syt 1 et Syt 2 dans les cellules hématopoïétiques, elles permettraient la régulation de la présentation des molécules d'histocompatibilité de classe II dans les neutrophiles (Lindmark et al., 2002) ou la dégranulation des mastocytes (Baram et al., 1998).

Dans une lignée clonale dérivée des mastocytes, les cellules RBL (Rat basophilic leukaemia), Syt 9 aurait une fonction de régulation du transport entre le compartiment de recyclage et la membrane plasmique (Haberman et al., 2003).

Tableau II : Localisation des isoformes des Syt dans le pancréas endocrine

Tableau récapitulatif des données connues sur la localisation et la fonction des Syt dans les cellules du pancréas endocrine.

Syt	Pancréas endocrine		Notes	insulino-sécrétoires	Localisation	Fonction
	Cellules β	Cellules α				
Syt 1				✓	VLCD	Senseur calcique de l'exocytose
Syt 2				✓	VLCD	Senseur calcique de l'exocytose
Syt 9	✓			✓	VLCD	Senseur calcique de l'exocytose ?
Syt 3			✓	✓	Membrane plasmique	?
Syt 5		✓		✓	VLCD	Senseur calcique de l'exocytose ?
Syt 6		✓		✓	Membrane plasmique	?
Syt 10	?	?	?	?	?	?
Syt 4	✓			✓	Appareil de Golgi	?
Syt 11	?	?	?	?	Appareil de Golgi ?	?
Syt 7	✓	?	✓	✓	VLCD ? Membrane plasmique ?	Senseur calcique de l'exocytose ?
Syt 8	?	?	✓	✓	?	?
Syt 12	?	?	?	?	?	?
Syt 13	?	?	?	?	?	?
Syt 14	?	?	?	?	?	?
Syt 15	?	?	?	?	?	?
Syt 16	?	?	?	?	?	?

Dans le pancréas endocrine, Syt 1 et Syt 2 ne sont pas exprimées dans les cellules insulino-sécrétoires (Brown et al., 2000; Jacobsson et al., 1994). Syt 9 est, à l'inverse, présente dans les cellules β pancréatiques de souris où elle est localisée sur les VLCD (Iezzi et al., 2004). Dans les lignées insulino-sécrétoires clonales dérivées des cellules β , Syt 1 et Syt 2 sont toutefois présentes. Elles sont portées par les granules contenant l'insuline et jouent le rôle de senseur calcique de l'exocytose (Lang et al., 1997a).

3.2 - Syt 3, Syt 5, Syt 6 et Syt 10

Les isoformes Syt 3, Syt 5 et Syt 6 sont présentes dans les cellules des îlots de Langerhans mais avec des distributions diverses en fonction du type cellulaire. Syt 3 n'est notamment pas exprimée dans les cellules β mais est détectée au niveau protéique dans les cellules positives à la somatostatine (Gut et al., 2001). Dans ce cas, sa localisation est membranaire. De même Syt 6, exprimée par les cellules β pancréatiques de souris (Gut et al., 2001), est présente à la membrane plasmique, ou dans un compartiment proche de celle-ci (Butz et al., 1999). La localisation de Syt 5 sur les VLCD des cellules α pancréatiques de rat a été démontrée (Saegusa et al., 2002). Cette isoforme ne semble pas présente dans les cellules β primaires, elle est pourtant exprimée dans les cellules des lignées clonales qui en sont dérivées. L'implication de Syt 5 dans la régulation de la sécrétion d'insuline a été évoquée (Iezzi et al., 2004), aucune fonction n'est encore attribuée aux autres isoformes de cette sous-famille dans les cellules pancréatiques.

Dans les cellules RBL, Syt 3 serait impliquée dans le transport entre endosome précoce et compartiment de recyclage (Grimberg et al., 2003).

Concernant Syt 10, la seule étude existante sur la localisation et la fonction de cette isoforme précise une localisation dans deux zones particulières du cerveau : l'hippocampe et le cortex piriforme. L'expression de cette isoforme est induite lors d'un épisode de crise d'épilepsie (Babity et al., 1997).

3.3 - Syt 4 et Syt 11

La localisation de Syt 4 à proximité du réseau trans de l'appareil de Golgi a été établie dans les cellules β pancréatique (Gut et al., 2001) et dans les cellules

neuroendocrines PC12 (Fukuda et al., 2003). Pourtant, sa fonction dans le transport des vésicules sécrétoires reste encore à établir.

Cette isoforme est également une isoforme neuronale dont l'expression varie au cours du développement (Berton et al., 1997). Comme Syt 10, l'expression de cette isoforme est induite lors d'un épisode de crise d'épilepsie (Vician et al., 1995).

La localisation de Syt 11 dans une structure du type de l'appareil de Golgi a également été envisagée dans une étude sur des cellules COS-7 exprimant transitoirement cette isoforme mais sa fonction reste inconnue (Fukuda et al., 2001a).

3.4 - Syt 7

De très nombreuses localisations subcellulaires ont été envisagées pour Syt 7 : la membrane plasmique dans les lignées neuroendocrines PC12 (Sugita et al., 2001), le réseau trans de l'appareil de Golgi ou le compartiment endosomal précoce également dans les PC12 (Fukuda et al., 2002c). Dans les cellules β pancréatiques, Syt 7 a été localisée sur les granules contenant l'insuline (Gao et al., 2000). Cette multitude de localisation peut être expliquée par le fait que les méthodes de localisation sont fondées sur la surexpression des protéines. L'absence d'anticorps spécifiques de chaque isoforme ainsi que la présence de nombreux variants d'épissage de Syt 7 rend donc cette localisation aléatoire. La mise à disposition d'un anticorps commercial dirigé contre Syt 7 a récemment permis de localiser cette isoforme sur les lysosomes des cellules dont la fonction n'est pas la sécrétion (fibroblastes par exemple) (Chakrabarti et al., 2003; Jaiswal et al., 2004; Reddy et al., 2001). Dans ce type de cellule, la libération du contenu des lysosomes est à la fois un moyen de défense, mais aussi un moyen de réparation des membranes. Ce type de sécrétion est régulée par le calcium et contrôlée par des protéines SNARE spécifiques, Ti-VAMP, Syntaxine 4 et SNAP-23, Syt 7 est le senseur calcique de cette exocytose (Rao et al., 2004).

3.5 - Syt 8 et Syt 12 à Syt 16

Pour l'isoforme Syt 8 qui est faiblement exprimée dans le cerveau, les seules localisations envisagées concernent l'épithélium du tubule rénal (Kishore et al., 1998) et l'acrosome du spermatozoïde (Hutt et al., 2002). Dans ce dernier cas, Syt 8 pourrait jouer un rôle dans la réaction acrosomiale nécessaire à la fécondation.

L'unique étude concernant Syt 13, propose pour cette isoforme un rôle dans le transport constitutif entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique (Fukuda and Mikoshiba, 2001a).

La localisation subcellulaire et la fonction des autres isoformes n'ont pas encore fait l'objet d'études, ni sur les cellules neuroendocrines, ni même sur les neurones.

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Les travaux existants sur la fonction des isoformes des synaptotagmines dans les cellules insulino-sécrétoires ont montré un rôle majeur de protéines dans la régulation de la sécrétion stimulée par le calcium (Brown et al., 2000; Gao et al., 2000; Gut et al., 2001; Lang et al., 1997a). Ces études ont notamment établi, dans une lignée clonale d'insulinome de rat (INS1E), le rôle de Syt 1 et Syt 2 dans la régulation de la sécrétion d'insuline (Lang et al., 1997a). D'autre part, dans une autre lignée clonale de souris (RINm5f) la transfection stable de Syt 3 ou Syt 7 a pour effet d'augmenter la sécrétion d'insuline stimulée par le calcium (Gao et al., 2000). Enfin, l'utilisation de cellules β primaires de souris a permis de montrer que le senseur calcique de la sécrétion d'insuline a des caractéristiques biochimiques compatibles avec celles de Syt 5 et Syt 7 (Gut et al., 2001). Les résultats semblent donc dépendre du type cellulaire. L'apparente redondance des Syt présentes sur les VLCD des cellules clonales dérivées des cellules β pancréatiques n'est pas réelle dans les cellules primaires. Syt 1, Syt 2 ou Syt 3 ne sont notamment pas exprimées dans les cellules β primaires.

De ce tableau complexe découlent plusieurs questions que nous allons aborder dans ce travail :

Quelles sont les isoformes exprimées, quelles sont leurs réelles distributions subcellulaires dans les cellules β pancréatiques ? Cette distribution est-elle différente des autres cellules neuroendocrines ?

Quelle est, ou quelles sont les isoformes qui jouent le rôle de senseur calcique de l'exocytose de l'insuline dans les cellules β ?

Si toutes, ou plusieurs, isoformes sont exprimées dans ces cellules, quel est le rôle de chacune d'elle ? En d'autres termes, la distribution des isoformes est-elle spécifique des tissus ou des compartiments cellulaires ?

RÉSULTATS PREMIÈRE PARTIE

QUELLE ISOFORME JOUE LE RÔLE DE SENSEUR CALCIQUE DE L'EXOCYTOSE DES CELLULES INSULINO-SÉCRÉTOIRES : SYT 7 OU SYT 9?

I/ INTRODUCTION

La sécrétion d'insuline par la cellule β pancréatique est dépendante d'une élévation de la concentration intracellulaire de calcium. Les mécanismes moléculaires liant cette élévation à la fusion membranaire ne sont que partiellement décrits (Jahn et al., 2003) et le senseur calcique de l'exocytose de l'insuline n'est pas strictement connu. La Syt 1 qui est le senseur calcique de la transmission synaptique, tout comme Syt 2 qui lui est très homologue, ne sont pas exprimées dans les cellules β pancréatiques. Cependant, des études sur les lignées clonales dérivées des cellules β ont démontré que Syt 1 et Syt 2 peuvent jouer le rôle de senseur calcique lorsqu'elles sont exprimées (Lang et al., 1997a).

Au sein de la famille des Syt, plusieurs isoformes possèdent des caractéristiques biochimiques, de liaison aux phospholipides ou aux protéines SNARE dépendante du calcium, compatibles avec la fonction de senseur calcique de la sécrétion. Bien que les domaines C2B des isoformes Syt 1 et Syt 9 diffèrent (Shin et al., 2004), la capacité de liaison aux phospholipides et aux protéines SNARE du domaine C2A de Syt 9 est similaire à celle de Syt 1 (Li et al., 1995). Ces résultats, ainsi que la très grande homologie de séquence peptidique de Syt 9 avec les membres de la même sous-famille, que sont Syt 1 et Syt 2 (Rickman et al., 2004b), font de cette isoforme un candidat au rôle de senseur calcique de l'exocytose de l'insuline.

De plus, les peptides recombinants contenant la fraction cytoplasmique de Syt 9 (Syt 9 C2AB) sont capables d'inhiber la sécrétion des catécholamines des cellules PC12 perméabilisées (Tucker et al., 2003). Enfin, dans un clone particulier de cellules PC12 n'exprimant pas Syt 1 (Fukuda et al., 2002a), Syt 9 semble tenir le rôle de senseur calcique. Pourtant, les peptides recombinants correspondants aux fragments cytoplasmiques d'autres isoformes sont également capables d'inhiber la libération des catécholamines des cellules PC12, ou HIT-T15, perméabilisées (Lang et al., 1997a; Tucker et al., 2003). Dans ce type d'expérience, Syt 7 montre même un effet inhibiteur plus important que Syt 9 (Tucker et al., 2003).

Syt 7 est également capable de lier les phospholipides de manière dépendante du calcium avec une EC_{50} de l'ordre du μM de calcium, valeur compatible avec la dépendance calcique de la sécrétion d'insuline (Vallar et al., 1987). La surexpression de cette protéine dans les cellules insulino-sécrétoires RINm5f augmente la sécrétion

d'insuline stimulée par le calcium (Gao et al., 2000). De plus, sa présence sur les granules sécrétoires des cellules β pancréatiques de souris en fait également un candidat au rôle de senseur calcique de l'exocytose (Gao et al., 2000).

La localisation subcellulaire de Syt 7 a donné lieu à de nombreuses hypothèses contradictoires et souvent dépendantes du type cellulaire. La présence de Syt 7 sur les lysosomes a été démontrée dans des cellules de type fibroblastique, qui ne sont donc pas spécialisées dans la sécrétion (Rao et al., 2004; Reddy et al., 2001). L'étude de la localisation de la protéine de fusion Syt 7-eGFP surexprimée dans les cellules PC12 décrit une localisation membranaire (Sugita et al., 2001), sur le réseau trans de l'appareil de Golgi, le compartiment endosomal précoce ou les VLCD (Fukuda et al., 2002c). A l'inverse, la distribution subcellulaire de Syt 9 n'avait pas fait l'objet d'une analyse dans les cellules insulino-sécrétoires jusqu'à une étude très récente montrant une colocalisation avec l'insuline (Iezzi et al., 2004).

Les deux isoformes Syt 7 et Syt 9 sont deux candidats au rôle de senseur calcique de l'exocytose de l'insuline. Nous nous sommes donc intéressés à comprendre le rôle de chacune d'elles dans la sécrétion d'insuline.

II / RÉSULTATS

A / Syt 7 et Syt 9 : deux protéines ubiquitaires

1 - Distribution cellulaire et tissulaire de Syt 7

Afin de connaître la distribution tissulaire de Syt7 dans les cellules insulino-sécrétoires, les cellules chromaffines et le cerveau de rat et de souris, nous avons analysé ces tissus par immunodétection (**figure R1-1A**). Nous pouvons ainsi montrer que Syt 7 est une isoforme ubiquitaire Elle est exprimée dans les cellules insulino-sécrétoires HIT-T15, MIN6 et β primaires, dans les cellules PC12 et chromaffines ainsi que dans le cerveau de rat et de souris.

Cette isoforme possède au moins trois variants d'épissage décrits : Syt 7 α , Syt 7 β , Syt 7 γ (Fukuda et al., 2002c; Sugita et al., 2001). Dans les cellules et les tissus testés, Syt 7 α , comportant des modifications post-traductionnelles (entre 40 et 50 kDa), est la forme majoritairement mise en évidence. A contrario, la forme longue correspondant à Syt 7 β (65 kDa) n'est retrouvée que dans le tissu cérébral et les cellules chromaffines primaires. C'est également la forme détectée dans les cellules fibroblastiques (Reddy et al., 2001), ce variant n'est donc pas une forme purement neuronale (Han et al., 2004a). Ce variant n'est pas non plus une forme spécifique des cellules primaires car nous ne la retrouvons pas dans les cellules β pancréatiques. Syt 7 γ , le variant le plus long connu, n'est pas mis en évidence dans les tissus testés. De plus, une forme très légère, environ 25 kDa, est mise en évidence par l'anticorps dans les cellules PC12 et les extraits de cerveau de souris et de rat. Cette forme est prépondérante dans la fraction soluble des synaptosomes de rats alors que les autres formes se retrouvent majoritairement dans la fraction membranaire (**figure R1-1B**). Cette forme, également décrite dans les PC12, (Tucker et al., 2003) a un comportement de protéine soluble compatible avec un variant d'épissage ne possédant pas de domaine transmembranaire (Craxton and Goedert, 1999).

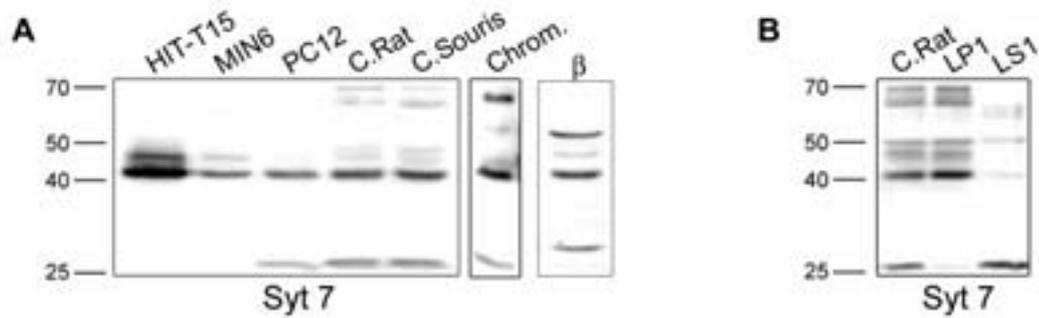


Figure R1-1 : Syt 7 est exprimée dans les cellules insulino-sécrétoires, les cellules chromaffines et le cerveau

A : Expression de Syt 7 dans les homogénats de cellules HIT-T15, MIN6, β primaires de souris (β), PC12 et chromaffines ainsi que les homogénats de cerveau de rat (C. Rat) et de souris (C. Souris) (60 μ g/piste). **B :** Syt 7 α et Syt 7 β sont également détectées dans la fraction membranaire (LP1) et une forme de 25 kDa dans la fraction soluble (LS1) des synaptosomes de rat.

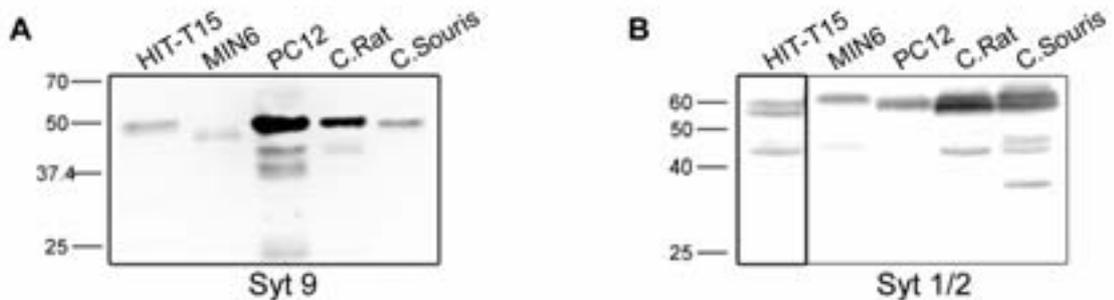


Figure R1-2 : Syt 9 et Syt 1 sont exprimées dans les cellules insulino-sécrétoires, les PC12 ainsi que dans le cerveau de rat et de souris

La distribution de Syt 9 (**A**) et de Syt 1/2 (**B**) est révélée dans les cellules HIT-T15, MIN6 et PC12 ainsi que dans le cerveau de rat (C. Rat) et de souris (C. Souris). Afin d'obtenir un signal pour Syt 1/2 dans les cellules HIT-T15, une exposition plus longue a été nécessaire (encadré en **B**).

2 - Distribution cellulaire et tissulaire de Syt 9

De même que Syt 7, Syt 9 est présente au niveau protéique dans toutes les cellules et tous les tissus testés, à une taille apparente légèrement inférieure à 50 kDa compatible avec la taille théorique de 43 kDa, déduite de la séquence nucléotidique (**Figure R1-2A**). Syt 9 est fortement exprimée dans les cellules PC12 et le cerveau de rat, alors que le signal observé dans les cellules MIN6 est beaucoup plus faible. L'anticorps utilisé est dirigé contre la séquence de la protéine de rat mais il n'existe qu'une très faible différence entre les deux espèces, rat et souris, de trois acides aminés seulement, dans la séquence antigénique (acides aminés 15 à 109). Les variations du signal reflètent donc sans doute des variations d'expression dépendantes du type cellulaire plutôt qu'une reconnaissance différente due à la différence d'espèce. Il est à noter également la différence de poids apparent de Syt 9 dans les MIN6, qui n'est pas retrouvée dans l'extrait de cerveau de la même espèce. Cette variabilité dans la taille de la protéine exprimée pourrait refléter des modifications post-traductionnelles qui varient d'un type cellulaire à l'autre et que l'on retrouve également pour Syt 1/2 (**figure R1-2B**) (Fukuda, 2002). La taille théorique de Syt 1 ou Syt 2 est de 47 kDa, le poids apparent révélé dans nos échantillons est supérieur à 60 kDa, en accord avec la migration observée dans d'autres systèmes (Perin et al., 1991).

B / Localisation subcellulaire des isoformes Syt 7 et Syt 9 dans les cellules neuroendocrines

1 - Syt 9, mais pas Syt 7, est présente sur les VLCD des cellules insulino-sécrétoires et des cellules chromaffines

Dans le but de définir la localisation subcellulaire des isoformes des synaptotagmines dans les cellules insulino-sécrétoires, nous avons réalisé une séparation des organelles des cellules MIN6 sur un gradient continu de saccharose.

La solution de saccharose contenant les différents compartiments cellulaires est fractionnée et les concentrations en saccharose, en protéines totales et en insuline sont

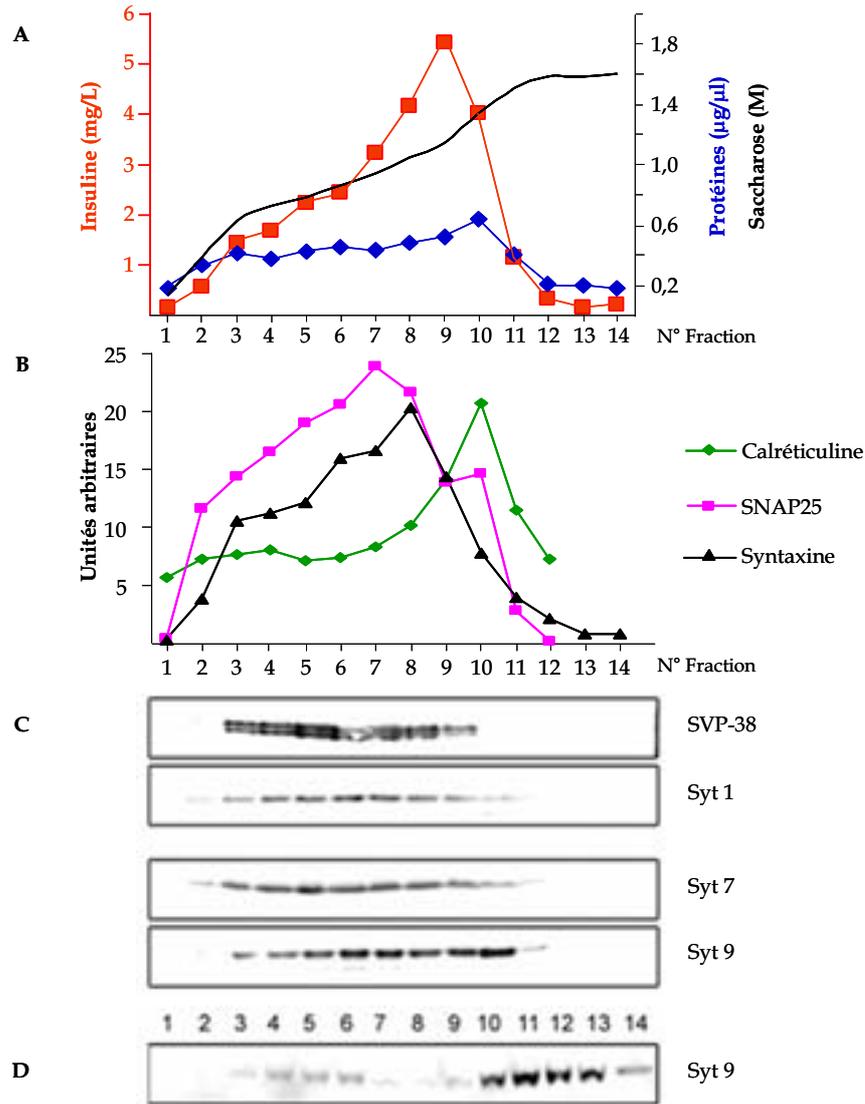


Figure R1-3 : Répartition subcellulaire des isoformes des synaptotagmines dans les cellules MIN6 après fractionnement sur un gradient continu de saccharose

A : Quantification de la concentration en saccharose, la concentration en protéines totales et en insuline de chaque fraction. **B** : Quantification densitométrique du signal d'immunodétection obtenu avec les anticorps anti-calréticuline, anti-SNAP25 et anti-syntaxine. **C** : Répartition de la synaptophysine (anti-SVP38), de la Syt 1 et des isoformes Syt 7 et Syt 9. **D** : Répartition subcellulaire de Syt 9 dans les cellules chromaffines après fractionnement sur un gradient continu de saccharose. Les MVTS sont présentes dans les fractions 3 à 6. Les granules contenant la chromogranine sont répartis entre les fractions 10 et 14.

mesurées (**figure R1-3A**). L'insuline est majoritairement présente dans les fractions 8 à 10, ces trois fractions contiennent donc principalement les granules sécrétoires (VLCD).

La caractérisation de la distribution des autres compartiments est ensuite réalisée par immunodétection (**figure R1-3B et C**). Les micro vésicules de type synaptique (Synaptic Like Microvesicles, MVTS), plus légères que les vésicules contenant l'insuline et révélées par la présence de la synaptophysine (SVP38), sont présentes dans les fractions 5, 6 et 7 majoritairement. La syntaxine, t-SNARE présente dans les membranes plasmiques, se répartit majoritairement au sein des fractions 7 et 8 mais est aussi présente en plus faible quantité sur les vésicules de type synaptiques (**figure R1-3B**). Le profil du signal correspondant à SNAP-25, t-SNARE associée aux membranes plasmiques, suit celui de la syntaxine (**figure R1-3B**). Dans les cellules MIN6, Syt 1 est présente majoritairement dans les MVTS et peu dans les vésicules sécrétoires (**figure R1-3C**). Le signal obtenu se répartit de manière similaire à celui de la synaptophysine et différemment de celui de l'insuline. Cette répartition diffère de celle observée dans les cellules clonales INS-1E (Lang et al., 1997a). Enfin, le signal observé avec l'anticorps anti-calréticuline, protéine résidente de la lumière du réticulum endoplasmique est accru dans les fractions 9 à 11 (**figure R1-3B**).

La présence de Syt 7 dans les cellules MIN6 ainsi fractionnées est révélée sur les fractions 4 à 8 avec globalement la même intensité (**figure R1-3C**). Cette répartition large dans des fractions allant de 0,7 à 1 M de saccharose est compatible avec un compartiment endosomal, de recyclage ou de transport (Grimberg et al., 2003) et les MVTS. Nous avons donc vérifié ces deux hypothèses en immunofluorescence. Le compartiment endosomal précoce et de recyclage est mis en évidence par le marquage du récepteur à la transferrine (RTfn). Comme le montre la **figure R1- 4**, Syt 7 n'est pas colocalisée avec le récepteur de la transferrine. De plus, lorsque les MVTS sont marquées avec un anticorps dirigé contre la synaptophysine, aucune colocalisation n'est observée avec Syt 7 dans les cellules MIN6 (données non présentées).

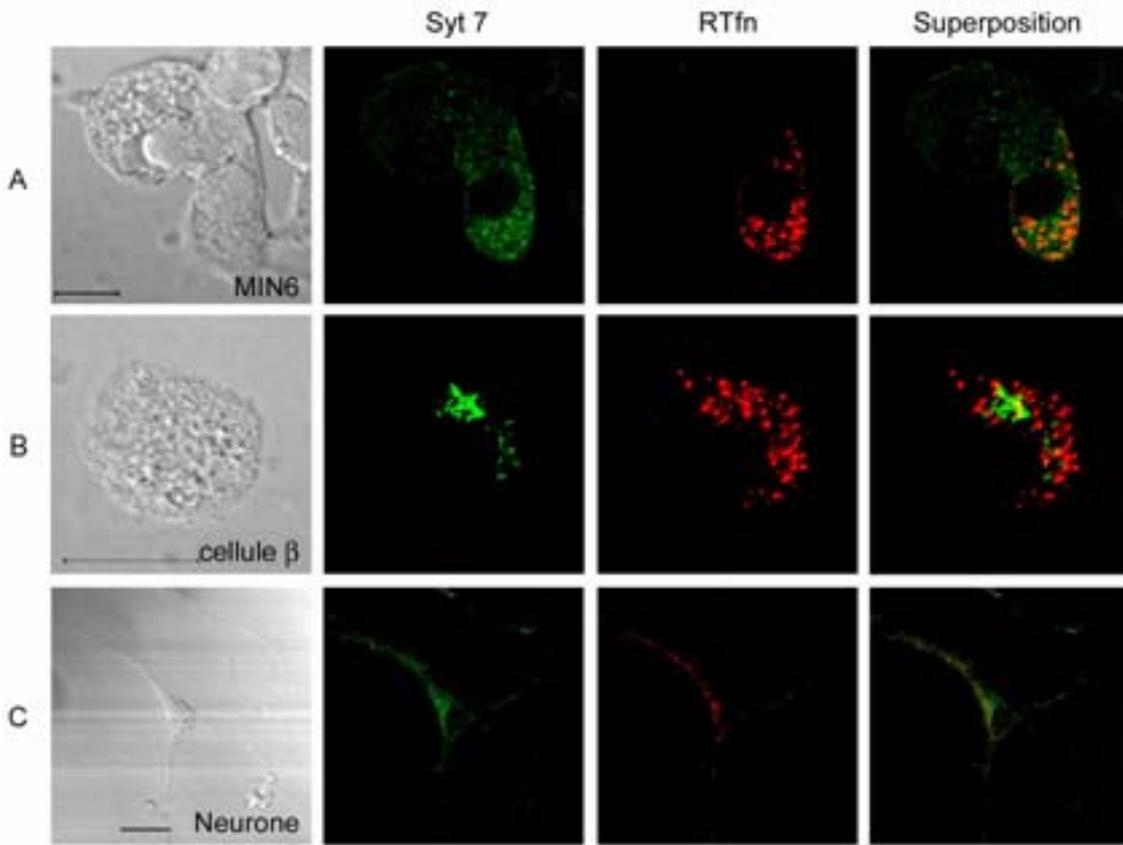


Figure R1-4 : Syt 7 n'est pas localisée sur le compartiment endosomal contenant le récepteur de la transferrine dans les cellules β pancréatiques, les cellules MIN6 ou les neurones

L'immunofluorescence est réalisée sur les cellules MIN6 (A), β pancréatiques (B), ou les neurones d'hippocampe de rat (C) avec un anticorps anti-Syt 7 ou anticorps anti-récepteur de la transferrine (RTfn). Barre de taille : 10 μm pour A et B, 20 μm pour C.

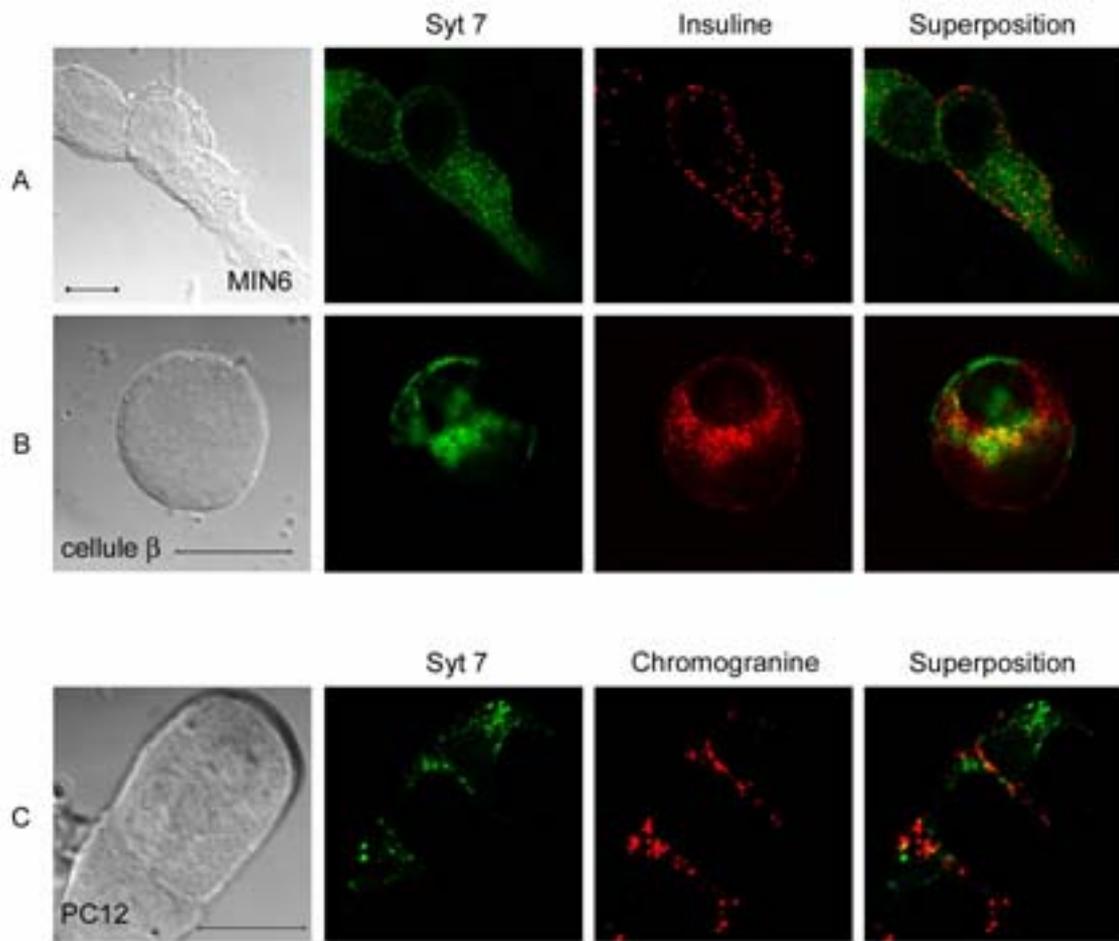


Figure R1-5 : Syt 7 n'est pas localisée sur les vésicules sécrétoires dans les cellules β pancréatiques, les cellules MIN6 ou PC12

La distribution subcellulaire de Syt 7 est étudiée en immunofluorescence sur les cellules MIN6 (A) les cellules β pancréatiques (B) ou les cellules PC12 (C) et comparée à la distribution du marqueur des granules. Le signal est obtenu avec un anticorps anti-Syt 7, le marquage des VLCD est réalisé avec un anticorps anti-insuline ou un anticorps anti-chromogranine. Barre de taille : 10 μm pour A et C, 20 μm pour B.

La distribution très différente de Syt 7 et des VLCD, observée avec le fractionnement sur gradient continu de saccharose, est confirmée en immunofluorescence (**figure R1-5**). Aucune colocalisation entre les marqueurs des granules sécrétoires (insuline et chromogranine) et Syt 7 n'est observée, à la fois pour les cellules MIN6, HIT-T15 et β pancréatiques, mais aussi pour les cellules PC12.

Comme le montre la **figure R1-3C** : Syt 9 se répartit sur deux compartiments ; les MVTs dans les fractions 5 à 7 et les granules sécrétoires dans les fractions 9 et 10. Cette présence de Syt 9 dans les deux types de vésicules est également retrouvée dans les cellules chromaffines (**figure R1-3D**). Ce résultat est partiellement confirmé en immunofluorescence sur les cellules insulino-sécrétoires. Nous retrouvons en effet, la colocalisation de Syt 9 avec l'insuline dans les cellules insulino-sécrétoires MIN6, HIT-T15 et β pancréatiques (**figure R1-6**). Cependant, Syt 9 n'est pas présente sur les granules contenant la chromogranine dans les cellules PC12. D'autre part, la concordance des distributions entre Syt 9 et Syt 1, présente sur les MVTs, dans les cellules MIN6 fractionnées, n'est pas retrouvée en immunofluorescence, aucune colocalisation n'est en effet détectée entre ces deux isoformes (**figure R1-7**).

Ces résultats montrent que Syt 7, si elle est présente sur le compartiment endosomal, devra se localiser plutôt au niveau de l'endosome tardif et que Syt 9 est présente sur les VLCD des cellules insulino-sécrétoires et des cellules chromaffines primaires.

2 - Syt 7 est localisée sur les lysosomes des cellules PC12 et des neurones embryonnaires d'hippocampe en culture

Syt 7 ayant été impliquée dans la voie d'exocytose des lysosomes dans les cellules fibroblastiques (Rao et al., 2004), nous avons testé en immunofluorescence la présence de cette isoforme sur les lysosomes, grâce à un marqueur spécifique : LAMP1. Nous avons également testé l'éventuelle concordance de répartition entre Syt 7 et la protéine v-SNARE spécifique de cette voie d'exocytose, Ti-VAMP (Rao et al., 2004).

Dans les cellules PC12, nous retrouvons une colocalisation partielle de Syt 7 avec LAMP-1 (**figure R1-8A**). La présence de Syt 7 sur le compartiment lysosomal est également observée dans les neurones d'hippocampe en culture (**figure R1-8B**).

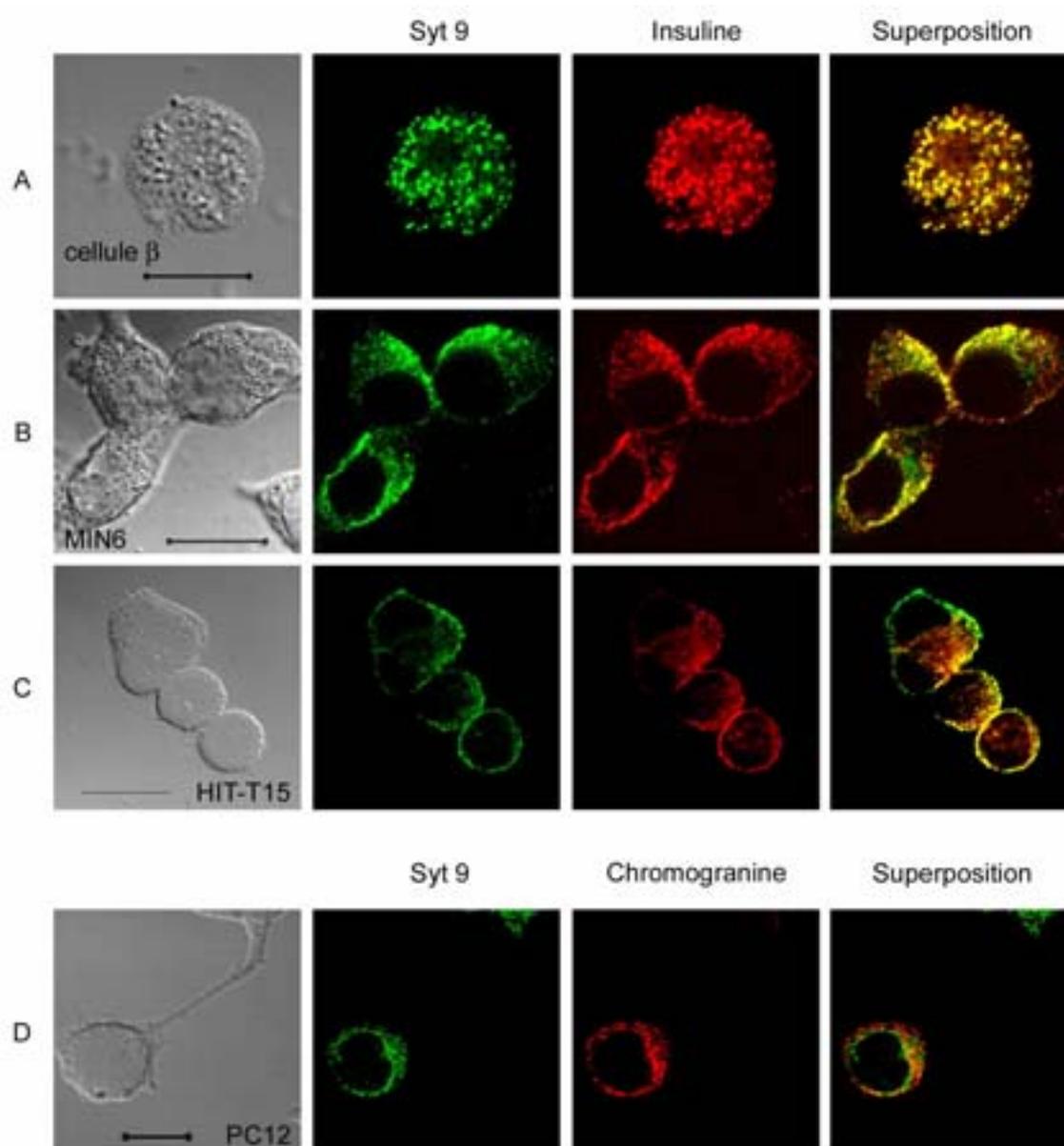


Figure R1-6 : Syt 9 est localisée sur les VLCD dans les cellules insulino-sécrétoires mais pas dans les PC12

Immunofluorescence réalisée sur des cellules β -pancréatiques (A), MIN6 (B) ou HIT-T15 (C) montrant la colocalisation de Syt 9 et de l'insuline. Dans les cellules PC12 (D), Syt 9 a une localisation différente de la chromogranine. Barre de taille : 10 μ m pour A et D, 20 μ m pour B et C.

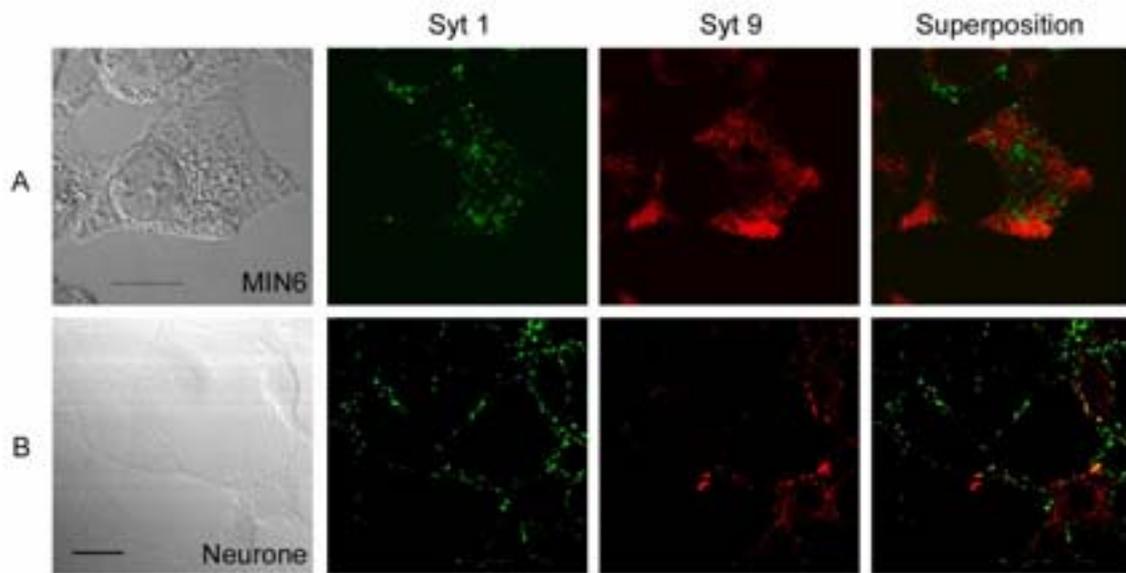


Figure R1-7 : Syt 9 et Syt 1 ne sont pas portées par le même compartiment cellulaire dans les cellules insulino sécrétoires et les neurones

La distribution des isoformes Syt 1 et Syt 9 est observée en immunofluorescence sur les cellules MIN6 (A), et les neurones d'hippocampe (B). Dans les trois types cellulaires, les localisations sous cellulaires de Syt 1 et de Syt 9 sont très différentes. Barre de taille : 10 μm pour A, 20 μm pour B.

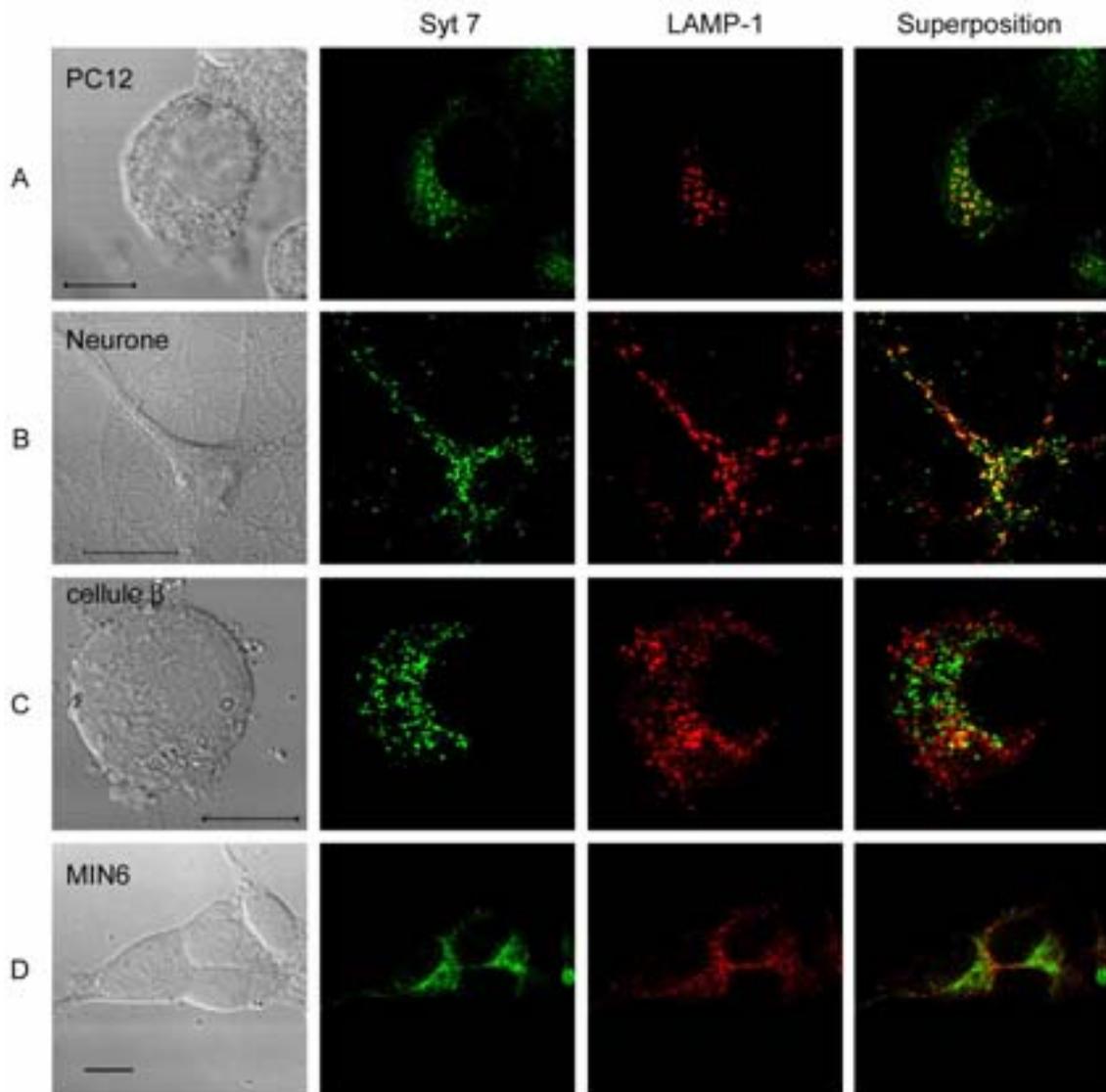


Figure R1-8 : Syt 7 est partiellement co-localisée avec LAMP-1 dans les PC12 et les neurones d'hippocampe embryonnaires en culture mais pas dans les cellules insulino-sécrétoires

La distribution de Syt 7 est observée en immunofluorescence sur les cellules PC12 (A), les neurones d'hippocampe (B), les cellules β pancréatiques (C) et les cellules MIN6 (D). Syt 7 est révélée par un anticorps anti-Syt 7, le compartiment lysosomal est révélé par un anticorps anti-LAMP-1. Barre de taille : 10 μm pour A, C et D, 20 μm pour B.

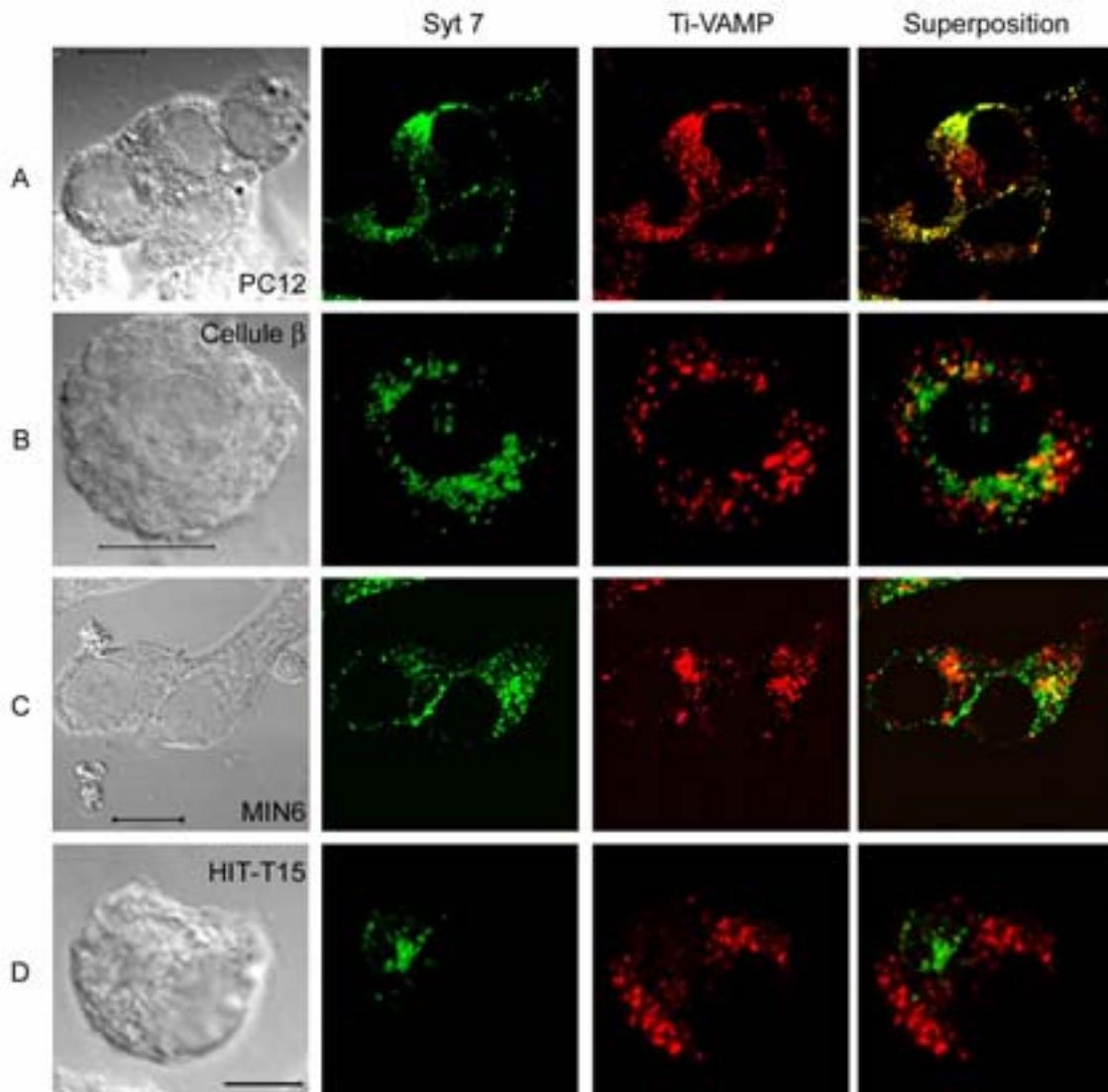


Figure R1-9 : Syt 7 est co-localisée avec Ti-VAMP dans les PC12 mais pas dans les cellules insulino-sécrétoires

La distribution de Syt 7 est comparée à celle de la protéine v-SNARE : Ti-VAMP spécifique des lysosomes en immunofluorescence sur les cellules PC12 (A), β -pancréatiques (B), MIN6 (C) et HIT-T15 (D). Barre de taille : 10 μ m.

Cependant, les signaux révélés pour ces deux protéines ont des distributions très différentes dans les cellules insulino-sécrétoires primaires ou les cellules MIN6 (**figure R1-8C et D**).

Une co-localisation partielle est observée entre Syt 7 et Ti-VAMP dans les cellules PC12 (**figure R1-9A**). A nouveau, cette co-localisation n'est pas retrouvée dans les cellules β primaires, MIN6 ou HIT-T15 (**figures R1-9B, C et D**).

C / Etude de la fonction de Syt 9 dans les HIT-T15 : sécrétion stimulée d'insuline

Dans les cellules β pancréatiques, Syt 9 est présente sur les granules contenant l'insuline. Elle est la seule isoforme des Syt portée par les granules sécrétoires décrite à ce jour. Syt 9 est donc un excellent candidat au rôle de senseur calcique de l'exocytose des cellules β pancréatiques.

Afin d'étudier le rôle potentiel de Syt 9 dans la sécrétion d'insuline, les cellules HIT-T15 sont transitoirement transfectées avec un plasmide codant pour l'hormone de croissance humaine (hGH) et le plasmide codant pour Flag-Syt 9. L'hormone de croissance, exprimée dans des cellules insulino-sécrétoires, est adressée aux VLCD et permet d'analyser la population de vésicules contenant à la fois l'hGH et Flag-Syt 9 (Wick et al., 1993). En utilisant cette approche, nous observons une augmentation d'un facteur 5 de la sécrétion d'hormone de croissance dans les HIT-T15 en présence de 50 mM de KCl (**figure R1-10**). La surexpression de la protéine Flag-Syt 9 dans ces cellules n'a pas d'effet, ni sur la sécrétion basale, ni sur la sécrétion stimulée d'hGH. La protéine Flag-Syt 9 est pourtant présente en quantité 10 fois plus importante que la protéine endogène (**figure R1-11A**). Les mêmes résultats (non montrés ici) ont également été obtenus avec une forme tronquée de Syt 9 ne contenant que le domaine cytoplasmique (acides aminés 48 à 386).

Pour mieux comprendre le rôle de Syt 9 dans la sécrétion d'insuline, nous avons par la suite utilisé plusieurs formes mutées de la protéine. Afin d'abolir la coordination du calcium sur les boucles des domaines C2 sans modifier la structure tridimensionnelle de la protéine, nous avons introduit des mutations ponctuelles sur le domaine C2A,

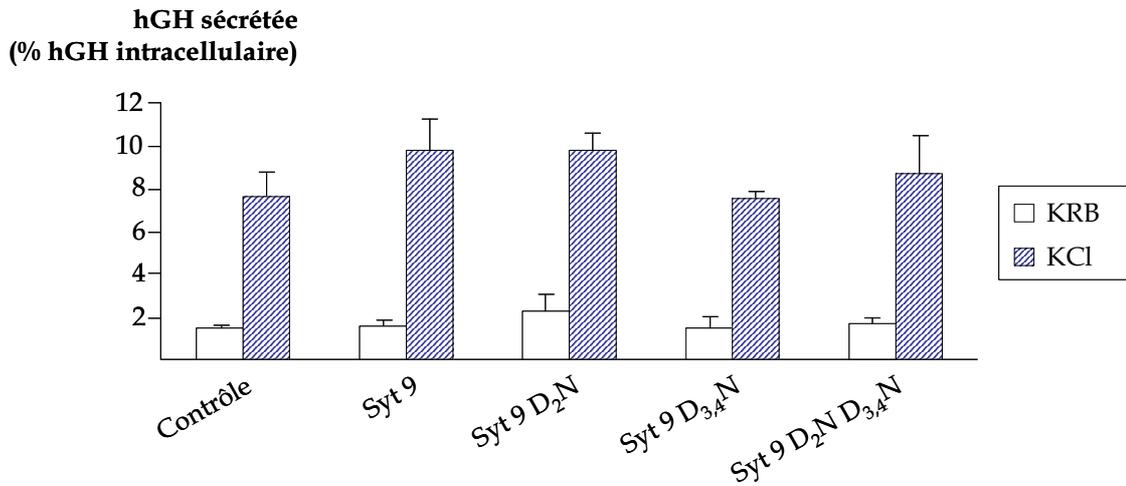


Figure R1-10 : La surexpression de Syt 9 sous la forme sauvage ou mutée pour les sites de coordination du calcium n'a pas d'effet sur la sécrétion stimulée par le KCl.

Les cellules HIT-T15 sont co-transfectées avec le plasmide codant pour l'hormone de croissance (hGH) et un plasmide vide (contrôle) ou contenant la forme sauvage (Flag-Syt 9) ou mutée de Syt 9 pour le site de coordination du calcium sur le domaine C2A (Flag-Syt 9 D₂N), sur le domaine C2B (Flag-Syt 9 D_{3,4}N) ou les deux (Flag-Syt 9 D₂N D_{3,4}N). La sécrétion stimulée par 50 mM KCl pendant 12 min est comparée à la sécrétion basale (KRB). Chaque condition est effectuée en double. La figure est représentative des résultats obtenus avec trois expériences indépendantes.

C2B ou les deux. Dans le premier cas, le deuxième aspartate du domaine C2A a été muté en résidu asparagine (Syt 9D₂N). Dans le deuxième cas, les troisième et quatrième résidus aspartate du domaine C2B ont été mutés en asparagine

(Syt 9D_{3,4}N). Une forme doublement mutée a également été produite, elle contient les trois mutations sur les deux domaines (Syt 9D₂N, D_{3,4}N).

Malgré la surexpression et la colocalisation partielle des protéines exogènes (**figure R1-11**), la sécrétion d'hormone basale ou stimulée par 50 mM de KCl n'est pas changée de manière significative en présence des formes mutées de la protéine Flag-Syt 9 (**figure R1-10**).

Le rôle direct de Syt 9 sur la sécrétion d'hormone de croissance lors d'une stimulation de 12 min par le KCl n'a pas pu être mis en évidence même lorsque la protéine est mutée au niveau des sites de coordination du calcium.

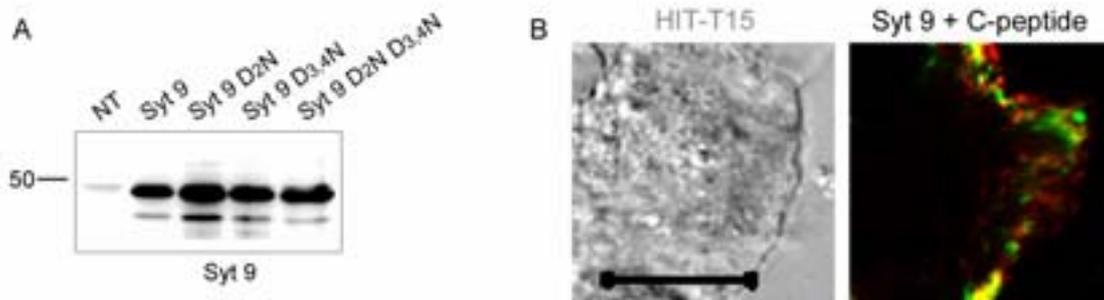


Figure R1-11 : Surexpression de Syt 9 dans les cellules HIT-T15

Les cellules HIT-T15 sont transfectées avec le plasmide codant pour la protéine Flag-Syt9 sauvage ou les formes mutées pour les sites de coordination du calcium sur le domaine C2A (Flag-Syt 9 D₂N), C2B (Flag-Syt 9 D_{3,4}N) ou les deux (Flag-Syt 9 D₂N-D_{3,4}N). (A) Le niveau d'expression de Syt 9 dans les cellules transfectées avec les différents plasmides est comparé au niveau d'expression de la protéine endogène. (B) La localisation de la protéine Flag-Syt 9 D₂N-D_{3,4}N surexprimée (vert) est comparée à celle du c-peptide, dont la séquence codante est transfectée avec celle de Flag-Syt 9 D₂N-D_{3,4}N. Barre de taille : 10 µm.

III / DISCUSSION

Dans les études précédentes, les localisations subcellulaires proposées pour Syt 7 dans les neurones, les cellules chromaffines ou insulino-sécrétoires ont été diverses : membrane plasmique (Sugita et al., 2001), réseau trans de l'appareil de Golgi (Fukuda et al., 2002c), VLCD (Fukuda, 2004; Gao et al., 2000) et lysosomes (Martinez-Arca et al., 2001). Afin de conclure sur cette localisation, nous avons étudié la colocalisation de Syt 7 avec différents marqueurs spécifiques des compartiments cellulaires en immunofluorescence. Par cette méthode, nous avons mis en évidence une absence de colocalisation de cette isoforme avec un marqueur spécifique des VLCD dans les cellules insulino-sécrétoires. L'utilisation de la protéine recombinante, portant les domaines C2 de Syt 7, dans les cellules insulino-sécrétoires perméabilisées a montré le rôle inhibiteur de cette isoforme dans la sécrétion d'insuline (Gut et al., 2001). Cette inhibition peut mettre en évidence un rôle direct, comme une liaison de Syt 7 avec les effecteurs du senseur calcique endogène. Notre étude de localisation exclut la participation de Syt 7 à la fonction de senseur calcique endogène de la sécrétion d'insuline. Le marquage obtenu avec un anticorps dirigé contre la protéine endogène n'est pas non plus caractéristique de la membrane plasmique. Cette apparente contradiction avec les études précédentes (Fukuda, 2004; Sugita et al., 2001) est justifiée par le fait que nous avons cherché à localiser la protéine endogène plutôt qu'une protéine exogène exprimée transitoirement ou même de façon stable.

Le rôle de Syt 7 comme senseur calcique de la voie d'exocytose spécifique des lysosomes a été envisagé récemment dans des cellules de type fibroblastique (Jaiswal et al., 2004; Martinez et al., 2000; Rao et al., 2004). Ces cellules, qui ne possèdent pas comme fonction primordiale la sécrétion, sont capables de libérer le contenu de leurs lysosomes en réponse à un influx calcique (Andrews, 2000). Cette voie de sécrétion particulière est utilisée pour la réparation des membranes (Reddy et al., 2001), la défense contre les agressions microbiennes (Andrews, 2000) ou à des fins d'invasion par le *Trypanosoma cruzi* (Caler et al., 2001). Elle est caractérisée par des protéines SNARE spécifiques : SNAP23, Syntaxine 4 et Ti-VAMP. Syt 7 est le senseur calcique spécifique de cette voie (Rao et al., 2004). Nous avons mis en évidence dans les cellules

PC12 et les neurones embryonnaires d'hippocampe en culture la présence simultanée de Syt 7 et de Ti-VAMP sur les lysosomes. Nous pouvons donc poser l'hypothèse de l'existence d'une voie de sécrétion spécifique des lysosomes dans des cellules à vocation sécrétoire. Pourtant, nous n'avons pas mis en évidence une telle colocalisation dans les cellules également sécrétoires que sont les cellules β pancréatiques.

De ces résultats découlent deux questions : (1) pour quelles raisons des cellules sécrétrices auraient conservé cette ancienne voie d'exocytose lysosomale ? (2) pour quelle raison seulement certaines cellules neuroendocrines possèdent cette voie ?

La différence de localisation de Syt 7 en fonction des études peut être envisagée sous l'angle d'une différence de localisation subcellulaire des multiples variants d'épissage de Syt 7. Nous avons mis en évidence plusieurs formes de Syt 7 dans les différents tissus testés. Le variant décrit dans la voie d'exocytose des lysosomes dans les cellules fibroblastiques (Rao et al., 2004) correspond à une forme de haut poids moléculaire (Martinez et al., 2000). Cette forme longue, correspondant à Syt 7 β (Fukuda et al., 2002c) et présente dans les homogénats de cerveau, serait localisée sur les lysosomes. La forme plus courte correspondant à Syt 7 α aurait alors une autre fonction et une autre localisation. Les cellules PC12 doivent être stimulées par le NGF (nerve growth factor) pour émettre des prolongements (Fukuda et al., 2003d), la présence du NGF dans le milieu pourrait permettre l'activation de la synthèse de la forme longue Syt 7 β que nous n'avons pas détectée dans les homogénats de cellules PC12 non différenciées. Cette interprétation est pourtant contredite par le fait que Syt 7 β n'est pas exprimée au stade embryonnaire E19 mais est fortement exprimée dans les homogénats de cerveau de rats adultes (Sugita et al., 2001). Cette observation est en défaveur d'un rôle spécifique de Syt 7 β dans la croissance axonale ou dendritique. De plus, ces formes hautes ne sont pas spécifiquement neuronales ou exprimées dans les cellules capables de division car elles sont présentes dans les cellules chromaffines primaires.

Les cellules PC12 comme les neurones embryonnaires en culture sont capables d'émettre des prolongements de type axonal ou dendritique. Pour permettre l'allongement de l'axone ou des dendrites, des vésicules, positives pour Ti-VAMP, fusionnent avec la membrane plasmique et amènent ainsi le matériel nécessaire au niveau de la zone de croissance (Martinez-Arca et al., 2001). Cette voie, n'existant que dans des cellules capables de différenciation ou de croissance, ne serait pas présente

dans les cellules β pancréatiques et pourrait donc expliquer la localisation différente de Syt 7.

La localisation subcellulaire de Syt 9 au niveau des VLCD, dans les cellules β pancréatiques suggère un rôle majeur de cette isoforme dans la sécrétion de l'insuline. L'effet de la surexpression de ces protéines sur la sécrétion stimulée a donc été étudié dans les cellules HIT-T15. La surexpression de la protéine sauvage Syt 9 n'a aucun effet sur la sécrétion stimulée. Ces résultats sont cohérents avec d'autres études qui ont également montré l'absence d'effet de la surexpression de Syt 1, ou Syt 2, dans les cellules chromaffines (Rickman and Davletov, 2003), ou les cellules insulino-sécrétoires (Iezzi et al., 2004; Lang et al., 1997a).

La mutation du résidu aspartate en position 145 de la séquence de Syt 9, et correspondant au deuxième site de coordination du calcium n'a pas non plus permis d'obtenir un effet sur la sécrétion stimulée par le KCl. L'effet dominant négatif de la surexpression est cependant probable grâce au fort taux de surexpression de la protéine mutée et sa localisation au niveau des VLCD.

Pour comprendre cette absence d'effet nous avons testé la capacité de liaison de la protéine mutante aux membranes. Dans le contexte cellulaire et avec une stimulation aussi forte que 1 mM de calcium libre, Syt 9 mutée (D2N) est encore capable de se lier aux membranes (résultats obtenus par Florence Grise au sein du laboratoire). Malgré un effet de la mutation correspondante sur Syt 1, sur la fonction de sécrétion (Robinson et al., 2002), cette seule mutation ne suffit pas à induire un effet dans nos cellules lors d'une stimulation par le KCl pendant 12 min. La diminution de l'affinité pour les liposomes vers des concentrations 10 fois plus élevées de calcium, décrite pour le même type de mutation sur Syt 7 (Sugita et al., 2001) ne semble pas observable dans notre essai. D'autres mutations plus drastiques, éliminant complètement la coordination du calcium (Lang et al., 1997a) sont en cours de réalisation au laboratoire.

Pourtant, l'absence d'effet de la surexpression de la protéine Flag-Syt 9 mutée pour deux résidus aspartate du domaine C2B suggère une importance primordiale du domaine C2A dans la fonction de Syt 9. La liaison du calcium étant fortement abolie sur le domaine C2B lorsque les troisième et quatrième résidus aspartate sont mutés en asparagine (Robinson et al., 2002), la sécrétion normale d'hormone de croissance

suggère que la liaison du calcium au seul domaine C2A semble suffire à la fonction de Syt 9. Ce résultat est en accord avec une étude récente montrant les caractéristiques spécifiques du domaine C2B de Syt 9, incapable de lier seul les phospholipides (Shin et al., 2004).

La fonction de Syt 9 dans la sécrétion d'insuline est encore à clarifier. Bien que cette isoforme soit présente sur les granules sécrétoires, elle peut être impliquée dans des étapes plus précoces de transport des vésicules matures également sous la dépendance d'un influx calcique (Heinemann et al., 1993; Rorsman et al., 2000). L'inhibition de l'expression de Syt 9 par la méthode d'ARN interférence dans les cellules INS-1E (Iezzi et al., 2004) provoque une inhibition de la sécrétion d'insuline stimulée par 15 mM de glucose. Une stimulation aussi longue par un élément métabolisable peut mettre en jeu bien plus que les dernières étapes de la sécrétion.

RÉSULTATS DEUXIÈME PARTIE

SYT 8 EST EXPRIMÉE SOUS UNE FORME SOLUBLE DANS LES CELLULES ENDOCRINES

INTRODUCTION À L'ARTICLE

Les synaptotagmines forment une famille de protéines partageant une même structure : un domaine court amino-terminal qui, dans le cas des isoformes portées par les vésicules synaptiques et les VLCD est intraluminal. Au domaine transmembranaire, fait suite un domaine de liaison de taille variable, deux domaines C2 conservés et une extrémité carboxy-terminale courte (Perin et al., 1991). La structure génomique de la famille des Syt varie en fonction des sous-classes. 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, 2000c). Le gène de Syt 7 est plus complexe, il est composé de 14 exons, alors que ceux de Syt 11 et Syt 4 en contiennent seulement 4 (Sudhof, 2002). Il existe pourtant quelques caractéristiques communes à l'ensemble des isoformes. Quelque soit la Syt, le domaine transmembranaire est codé par un exon unique, le deuxième (Fukuda and Mikoshiba, 2000c). De plus, un exon commun est conservé dans la famille, il code pour la partie amino-terminale du domaine C2B (Craxton and Goedert, 1999). Parmi les 16 isoformes connues à ce jour (Craxton, 2004), plusieurs sont exprimées sous la forme de variants d'épissage, notamment Syt 6 et Syt 7 (Fukuda and Mikoshiba, 1999a; Fukuda et al., 2002c; Sugita et al., 2001). D'autre part, les études de prédiction établie *in silico* à partir de la structure génomique, associées à l'analyse des transcrits, prédisent la présence de variants d'épissage pour Syt 1 et Syt 4 (Craxton and Goedert, 1999). L'épissage alternatif au niveau du domaine de liaison, entre le domaine transmembranaire et le premier domaine C2, a été décrit pour Syt 7 et Syt 1. Pour les autres isoformes, ainsi que pour Syt 7, l'épissage peut concerner le domaine transmembranaire (Fukuda and Mikoshiba, 1999a ; Craxton and Goedert, 1999).

La localisation et la fonction de certaines isoformes sont aujourd'hui connues. Alors que Syt 1, Syt 2, Syt 5 et Syt 9 sont localisées sur les VLCD et/ou les vésicules synaptiques (Fukuda et al., 2002a; Geppert et al., 1991; Lang et al., 1997a), Syt 4 se situe au niveau du réseau trans de l'appareil de Golgi (Berton et al., 2000; Gut et al., 2001; Ibata et al., 2000). Syt 3 et Syt 6 sont localisées à la membrane plasmique (Butz et al., 1999; Gut et al., 2001) et Syt 7 sur les lysosomes (Martinez et al., 2000). Mais nous avons

démonstré au chapitre précédent qu'il existe des variations de distribution d'un type cellulaire à l'autre et la localisation de la plupart des isoformes des Syt, dans les cellules neuroendocrines, n'est pas connue.

Les Syt peuvent être classées en fonction de différents critères, les caractéristiques biochimiques, les caractéristiques de la séquence nucléotidique (Sudhof, 2002) ou l'homologie de la séquence peptidique (Rickman et al., 2004b). Selon le critère de séquence peptidique des domaines C2, les sous-familles décrites ne contiennent pas Syt 8 qui est considérée comme "individuelle" car elle ne possède pas les 5 résidus aspartate nécessaires à la coordination du calcium sur les boucles des domaines C2. Les caractéristiques biochimiques de ses domaines C2 en font donc une isoforme particulière car elle ne possède pas la capacité de lier les phospholipides de manière dépendante du calcium (Li et al., 1995). Pourtant, d'un point de vue de l'alignement protéique, cette isoforme comporte une relative homologie avec Syt 1, 2 et 9. La liaison aux phospholipides membranaires suite à une stimulation calcique, caractéristique principale du domaine C2 de la protéine kinase C (PKC), n'est sans doute pas le seul mode d'action des protéines portant ces domaines (Hutt et al., 2002; Robinson et al., 2002; Zhang et al., 2004). La protéine recombinante GST-Syt 8 est par ailleurs capable de lier le dimère Syntaxine/SNAP25 en absence de calcium (Rickman et al., 2004a) ainsi que les inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate (Ibata et al., 1998).

L'ARNm codant pour Syt 8 est présent dans les cellules insulino-sécrétoires (Gut et al., 2001). De plus, la protéine recombinante contenant le fragment cytosolique de Syt 8 inhibe la sécrétion stimulée dans les cellules HIT-T15 perméabilisées (Gut et al., 2001). Nous avons donc cherché à définir l'expression protéique et la localisation de cette isoforme dans les cellules β pancréatiques.

Synaptotagmin 8 is expressed as a soluble protein in endocrine cells

*Carole Monterrat, Florence Grise and Jochen Lang**

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

* To whom correspondance should be addressed: j.lang@iecb.u-bordeaux.fr

Keywords: pancreatic β -cells; calcium; subcellular distribution

Abstract

We have investigated the expression of the synaptotagmin (syt) family member syt8 using an immunopurified antipeptide antibody directed against a C-terminal sequence and without crossreactivity towards syt 1 to 13. A single 40 kDa band was detected in clonal β -cells and to a lesser degree in brain suggesting the presence of only one splice variant. Subcellular fractionation and immunofluorescence revealed a distribution and sedimentation behaviour compatible with a soluble protein. In contrast to other C₂-domain containing proteins, syt 8 was not translocated upon a raise in cytosolic calcium and should therefore not intervene in calcium-evoked membrane fusion.

I/INTRODUCTION

Synaptotagmins (Syt) form a large family of calcium-sensing proteins and are 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 C₂-domains. The two isoforms of Syt which have been studied in most detail, Syt 1 and 2, bind phospholipids and SNARE proteins in a calcium-dependant fashion via the C₂-domains and thereby attach to lipid membranes and protein complexes involved in exocytosis (Evans et al., 2004; Jahn et al., 2003). Genetic, electrophysiological and biochemical evidences have established their role as a calcium-sensor in membrane fusion during exocytosis (Jahn et al., 2003; Koh and Bellen, 2003). Certain isoforms have been localised on defined subcellular compartments. Whereas Syt 1, 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), Syt 3 and 6 are found on plasma membranes (Butz et al., 1999; Gut et al., 2001), Syt 4 resides in proximity of the trans-Golgi network (Berton et al., 2000; Gut et al., 2001; Ibata et al., 2000) and Syt 7 on lysosomes (Martinez et al., 2000). However, distinct cell-type specific distributions have been observed (Martinez et al., 2000; Sugita et al., 2001) and in fact subcellular location has not been reported for the majority of synaptotagmins.

Synaptotagmins can be classified according to their biochemical properties or by sequence alignment (Craxton, 2004; Li et al., 1995; Rickman et al., 2004b). The latter indicates a close relationship between Syt 1, 2, 8 and 9. Interestingly, Syt 1, 2 and 9 are implicated in the regulation of exocytosis of LDCVs in neuroendocrine and endocrine cells including insulin-secreting clonal β -cells (Elferink et al., 1993; Fukuda et al., 2002a; Gut et al., 2001; Iezzi et al., 2004; Lang et al., 1997a). Moreover, we have previously observed that Syt 8 RNA is expressed in insulinoma cells and recombinant C₂-domains of Syt 8 inhibit exocytosis in permeabilized β -cells (Gut et al., 2001). We have therefore addressed the subcellular localisation of this isoform in insulin secreting cells.

II / MATERIALS AND METHODS

Material:

The following reagents were used: glutathione sepharose 4B (Amersham Biosciences, Saclay, France) and collagenase (Roche Diagnostics GmbH; Saclay, France), ampicillin (Calbiochem, Fontenay Sous Bois, France). All other reagents were from Sigma (Lyon, France). The following commercial monoclonal antibodies were employed: anti-VAMP2 (Synaptic Systems GmbH, Göttingen, Germany), anti-GST, anti-syntaxin/HPC-1, anti-SNAP25 and anti-synaptophysin/SVP-38 antibodies (Sigma, Lyon, France). HRP-linked anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies were purchased from Amersham Biosciences (Saclay, France), Cyan³-labelled anti-mouse secondary antibody was obtained from Jackson Immunoresearch (Immunotech, Marseille, France) and Alexa⁴⁸⁸-labelled anti-rabbit secondary antibody was purchased from Molecular Probes (Leiden, Netherlands).

Molecular cloning: 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 (Li et al., 1995). DNA sequence encoding the cytoplasmic domain of murine Syt 4 (residues 63 to 425) was excised from pSP73 (kind gift from Dr B. Hilbush) (Hilbush and Morgan, 1994) and subcloned into the SmaI/XhoI sites of pGEX4T-2. cDNA encoding cytoplasmic fragments of synaptotagmins were amplified 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, amino acids 92-523) 5'-AGCGGATCCAACCTCAGTGTCCTTCC-3' and 5'-AGCGAATTCTTATGGTGTGGACGGTGCC-3', syt 11 (EST AA050913; amino acids 36-430), 5'-GAAGATCTGTGTGGACGTGCTGCCACCAGCAGGC-3' and 5'-TCGAATTCCGTACTCGCTCAGACTGTGCCACTTGGC-3'; Syt 13 (MIN6, amino acids 68-426) 5'-ACGGATCCACGGAGCCTGTCCAGC-3' and 5'-AGCGAATTCTACAGGTGCAGTTGGTGCC-3'. The nomenclature of synaptotagmins is given according to Fukuda (Fukuda, 2003c). The PCR products, purified from an agarose gel by Microspin column (Qiagen, Courtaboeuf, France), were

directly inserted into the pGEM-T vector (Promega, Charbonnières, France), verified by sequencing of both strands and then subcloned into the *Bam*HI/*Eco*RI sites of the pGEX-2T vector.

Polyclonal Antibody production and immunoblotting: The polyclonal antibody against Syt 8 was produced by immunisation of New Zealand white rabbits with a synthetic peptide (CLALQPRLPLLRR; amino acids 383 to 394 of Q9R0N6) coupled to KHL using a commercial service (Covalab; Lyon, France). The resulting antiserum was affinity-purified by sepharose coupled to the peptide (Syt8ip) and used throughout at a concentration of 35 ng/ml (immunoblots) or 140 ng/ml (immunofluorescence). Recombinant proteins were obtained in *E. coli* BL21 (DE3), transformed with pGEX vectors as described. SDS-PAGE, immunoblots, visualisation and quantification was performed as published (Boal et al., in press).

Cell culture and fluorescence microscopy: HIT-T15 and MIN6 cells were cultured as described (Gut et al., 2001). 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. Fluorescence microscopy was performed as published and images were obtained using a LSM 510 META and a 100x objective.

Post-nuclear supernatants, subcellular fractionation and in vitro translocation: Cells were washed twice with PBS pH 7.4 (without Mg²⁺), detached by incubation with 10 mM EDTA-PBS for 5 min at 37°C and centrifuged at 800 g for 5 min at 4°C. Pelleted cells were resuspended in appropriate buffer for each experiment and sonicated for 2 min on ice. Brain extracts were prepared as published (Lang et al., 1997a). Post-nuclear supernatants (PNS) were obtained by a 10 min centrifugation of cells or brain extracts at 1000g and at 4°C. Subcellular fractionation by velocity sedimentation on sucrose gradient was performed as described (Zhang et al., 1999). Protein was measured by Bradford assay (Biorad, Marnes-la-Coquette France), insulin concentration was determined by ELISA (Mercodia, Uppsala Sweden), and the distribution of organelle markers was detected by immunoblotting. For subcellular

fractionation by ultracentrifugation detached and pelleted cells (prepared as described above) were resuspended in hypotonic buffer (Tris 25 mM pH 7, EDTA 1mM, EGTA 1mM, 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Pepstatin, 1 µg/ml Leupeptin, 0.5 mM PMSF). PNS were ultracentrifuged at 100,000g for 2 hours at 4°C. For in vitro translocation, detached and pelleted MIN6 cells were incubated for 5 min at 37°C in intracellular buffers (140 mM L-glutamic acid/monopotassium salt, 5 mM NaCl, 7 mM MgSO₄, 20 mM HEPES, pH 7; 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Pepstatin, 1 µg/ml Leupeptin, 0.5 mM PMSF) either containing 2 mM EGTA or 2 mM CaCl₂ with 10 µM ionomycin, subsequently sonicated on ice for 2 min. PNS were ultracentrifuged at 160,000g for 1 hour at 4°C and finally resuspended in EGTA or calcium buffer.

III/ RESULTS AND DISCUSSION

Sequence comparison and prediction of antigenicity indicated that the C-terminus of Syt 8 could offer a specific and sufficiently antigenic sequence to avoid cross-reactivity with other isoforms. In addition, splice variations are not predicted for the last exon in Syt 8 (Craxton, 2004) and the peptide is fully conserved in rat and mouse. Moreover, blast searches using the last 30 amino acids of Syt 8 suggested the absence of similar sequences in the mouse genome within the region of the antigenic peptidic sequence chosen for immunisation. Specificity of the obtained and immunopurified antiserum was tested against recombinant cytosolic domains of Syt 1 to 13 (Fig 2-1). The anti-syt 8 antibody recognized only Syt 8 but no other isoforms. It should be noted that the recently identified isoforms Syt 14 to 16, which have not been tested here, do not exhibit any homology to the C-terminus of Syt 8.

The antibody recognized a single band of 40 kDa in homogenates from the insulinoma cells HIT-T15 and MIN6 as well as in pheochromocytoma PC12 cells and brain extracts from rat and mouse (Fig. 2-2A). The expression levels were higher in neuroendocrine and endocrine cells than in brain extracts which is in line with the known extra-neuronal expression of Syt 8 (Li et al., 1995) and expression profiles estimated from the distribution of EST-clones. In chromaffin cells we could not detect any signal for Syt 8 by immunoblotting or by immunofluorescence (data not shown). As shown in Fig. 2-2B, the intensity of the immunoreactive band in endocrine cells and brain homogenates was considerably diminished by co-incubation with the antigenic peptide further indicating the specificity of the antibody employed. Alternative splicing of Syt 8 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 which range from 25, 40 and 44 kDa (Craxton, 2004). Previous reports using antibodies generated against Syt 8 reported protein sizes of 52 kDa in kidney and 40 kDa in mouse sperm acrosomes (Hutt et al., 2002; Kishore et al., 1998). Transient expression of Syt 8 containing an additional T7 epitope in COS-7 cells resulted in a protein migrating below 45 kDa (Fukuda et al., 2001e). The relative migration observed in our experiments is therefore compatible with those expected for Syt-8.

To investigate the subcellular distribution of Syt 8, we performed subcellular fractionation on a continuous sucrose gradient (Fig. 2-3). The relative distribution of organelle markers coincided with those reported previously for other insulinoma cells (Lang et al., 1997a; Lang et al., 1995; Zhang et al., 1999). Secretory granules (insulin) migrated mainly at fractions 8 to 10 followed by the endoplasmic reticulum as given by the distribution of calreticulin. The SNARE proteins syntaxin and SNAP25 were mainly found in fractions 6 to 8 compatible with the density of approximately 1 expected for plasma membranes. The broad distribution of the two markers reflects their 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. In contrast, Syt 8 migrated in the first fractions of the gradient indicating its presence either on light membranes/vesicles of very low density, or alternatively, a behaviour compatible with a cytosolic protein.

To clarify this issue, we performed immunochemical staining of clonal β -cells (Fig. 2-4). Immunoreactivity for Syt 8 was found in both cases dispersed throughout the cytosol although the distribution was not completely homogeneous. Immunofluorescence was slightly more concentrated in perinuclear regions and this was more prominent in MIN6 than in HIT-T15 cells. As MIN6 cells are more spread out than HIT-T15 cells this may facilitate observation. We further characterized the distribution of Syt 8 by ultracentrifugation (Fig. 2-5) either in hypotonic buffered Tris or in intracellular buffer. In both cases Syt 8 was entirely found in the supernatant and behaved thus again as a soluble protein. In an assay based on the use of recombinant proteins the cytosolic domain of Syt 8 still binds to the SNARE proteins syntaxin 1 or SNAP25 (Rickman et al., 2004b). As Syt 8 was not captured by the plasma membrane in our assay, native Syt 8 seems to behave differently in the cellular environment and a corresponding ion composition of the buffer used.

This behaviour may either be due to the absence of the hydrophobic domain encoded by exon 2 or this hydrophobic region may not form a transmembrane domain. Exon skipping leading to the absence of transmembrane domains have indeed been reported for Syt 1, 4, 6 and 7 (Craxton and Goedert, 1999; Fukuda and Mikoshiba, 1999a). Our attempts to settle this point by RT-PCR was unsuccessful and may well be

explained by the predicted transcript complexity affecting the N-terminus (Craxton, 2004). This point is further underscored by the absence of spliced N-terminal EST clones in the different databases. We also compared the behaviour of the transmembrane domains of Syt 1 to 9 by an *in-silico* approach. The program used, MPex (MPex), employs the Wimley-White hydrophathy scale and is therefore suitable to distinguish interfacial from transmembrane domains. We could not detect any substantial difference between the predictions for syt 8 and the other isoforms and ΔG values for partition from the interface into the bilayer ranged from -4.4 to -6.97 Kcal/mol with -5.5 for Syt 8 using a window of 22 amino acids. Although caution has to be exerted upon interpretation of transmembrane predictions (Chen et al., 2002), this approach at least strongly suggest that the corresponding sequence in Syt 8, if present, can anchor the protein. We therefore assume that Syt 8 detected by our antibody does not contain exon 2. Moreover, as the extreme C-terminus is predicted to be conserved in Syt 8, all splice variants should be detected by the antibody indicating that the soluble form is at least the predominant species in endocrine and PC12 cells.

In view of the soluble nature of Syt 8 in biochemical terms, we tested whether this protein is capable to translocate to biological membranes upon raises in free calcium. To this end cells were incubated in intracellular buffer without or with calcium and ionomycin and subsequently separated into soluble and membrane fractions. Under these conditions the C₂-domain of protein kinase C fully translocates to the membrane fraction, in contrast, Syt 8 remained soluble (Fig. 2-5). We also determined the distribution of the integral membrane proteins VAMP2 and syntaxin as an additional control to ensure that membranes were indeed separated from soluble components (Fig. 2-5).

In conclusion we demonstrate here that Syt 8, similar to other isoforms, can exist as a soluble protein and this form is the prevalent one in the cells and tissues examined. Syt 8 has been reported to bind in a cation-insensitive manner to inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate via its C2B domain (Ibata et al., 1998). A very rapid, transient increase in this compound has been observed during stimulation of β -cells (Alter and Wolf, 1995; Biden et al., 1987) and these rapid dynamics will obviously escape our assays. Syt 8 may be involved in functions linked to Ins-1,3,4,5-P₄, which may regulate vesicular traffic.

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 (BQR2002/3).

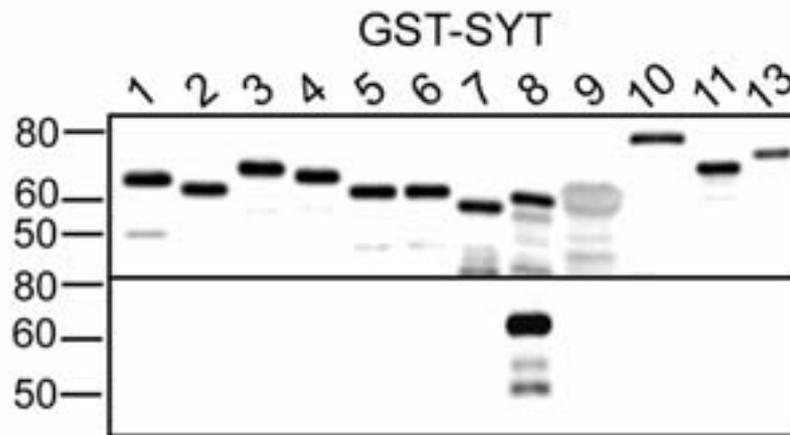


Figure R2-1 : Specificity of immunopurified anti-syt8 antibody. Immunostaining of recombinant GST-fusion proteins of cytosolic domains of synaptotagmins (GST-syt) with anti-GST (upper panel) or anti-syt 8ip (lower panel). Numbering of syt isoforms is given according to Fukuda (Fukuda, 2003c).

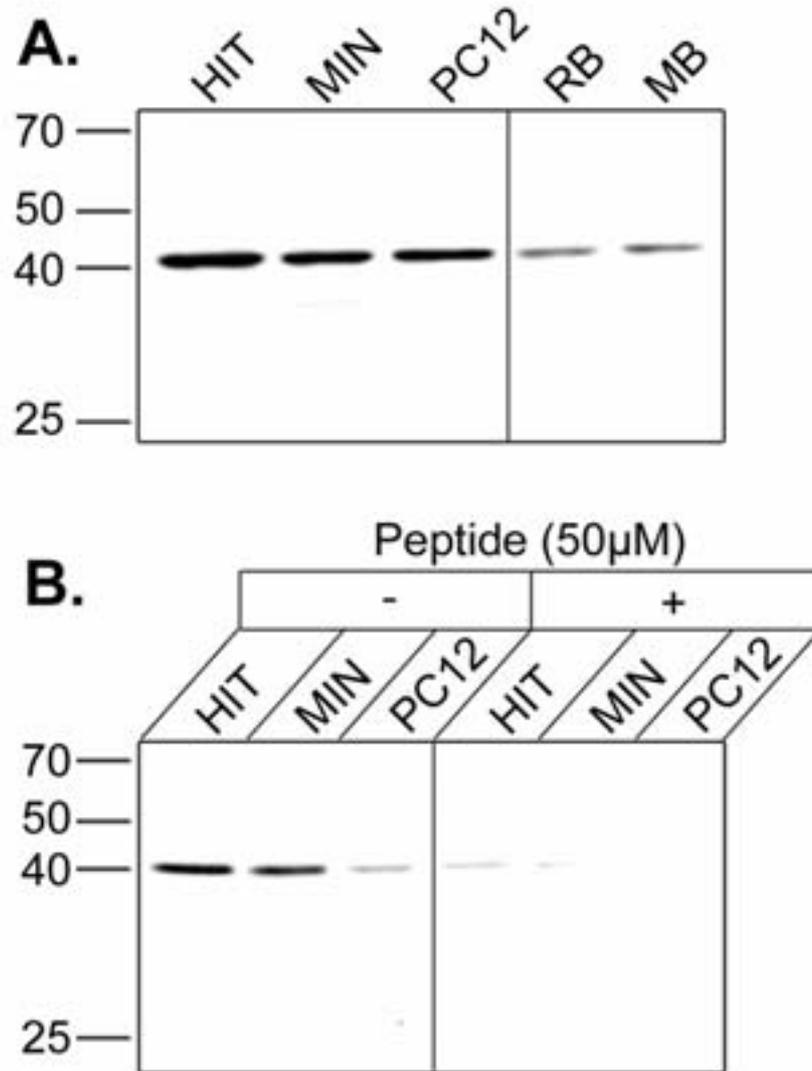


Figure R2-2 : Expression of synaptotagmin 8 in clonal β -cells, pheochromocytoma cells and brain extracts. (A) 60 μ g of postnuclear supernatants from HIT-T15, MIN6 or PC12 cells and homogenates from rat (RB) or mouse brain (MB) were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-syt 8 (35 ng/ml). (B) Blots were incubated with anti-syt 8 in the absence or presence of 50 μ M peptide used for immunisation.

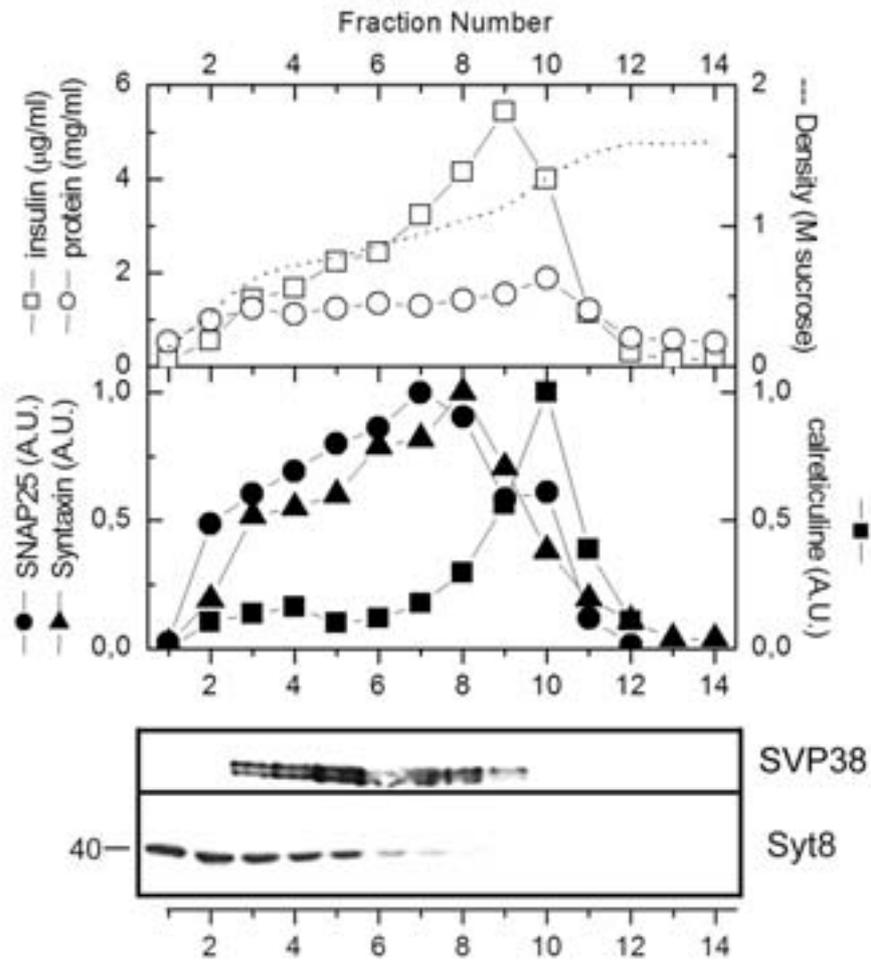


Figure R2-3 : Subcellular distribution of synaptotagmin 8 in clonal β cells.

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). Bottom panel: immunoblot for synaptophysin (SVP38) and syt 8.

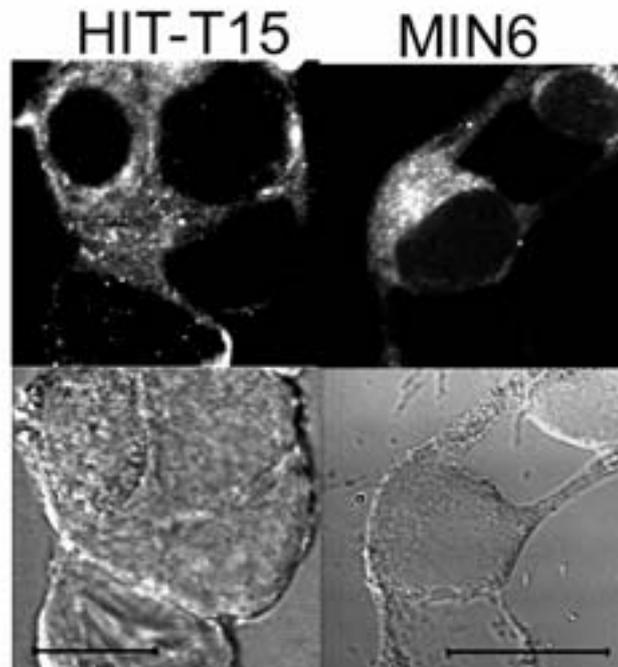


Figure R2-4 : Immunoreactivity of HIT-T15 or MIN6 cells with anti-syt8.

Immunofluorescence is given in upper panels (anti-syt8, 140 ng/ml), phase contrast in lower panels. Bar graphs equal 10 µm (HIT-15) or 20 µm (MIN6).

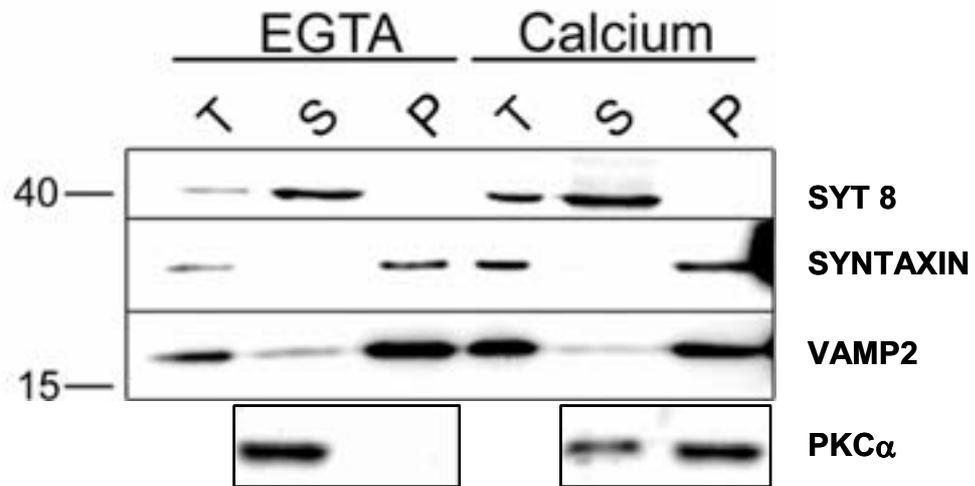


Figure R2-5 : Synaptotagmin 8 does not translocate upon increases in intracellular calcium.

Cells were incubated in hypotonic buffer (A) or intracellular buffers in the presence of EGTA or of 2mM calcium and 10 μ M ionomycin (Calcium) at 37°C (B), sonicated and ultracentrifuged. An aliquot of the initial sample and obtained supernatants (S) or pellets (P) were immunoblotted for Syt 8, syntaxin 1, VAMP2 or PKC α .

CONCLUSIONS DE L'ARTICLE

La production d'un anticorps spécifique de Syt 8 nous a permis de démontrer l'existence d'une forme soluble de cette protéine. Cette forme majoritairement exprimée dans les cellules insulino-sécrétoires n'est cependant pas retrouvée dans les cellules chromaffines primaires mais est faiblement exprimée dans le cerveau de rat et de souris. Le comportement biochimique de Syt 8, compatible avec un variant d'épissage, ne possédant pas de domaine transmembranaire est étonnant bien que de tels variants aient été décrits pour d'autres isoformes (Craxton and Goedert, 1999 ; Fukuda and Mikoshiba, 1999a). La fonction d'une isoforme soluble de la synaptotagmine, incapable de lier les phospholipides de manière dépendante du calcium, n'est pour le moment pas connue.

Il existe plusieurs familles de protéines portant 1 ou 2 domaines C2 impliquées dans le transport ou la sécrétion des neuromédiateurs. Les protéines Rabphilin, Noc2 ou Rim participent à la sécrétion (Fukuda, 2003a). La protéine Rabphilin 3a est, par exemple, un effecteur de la petite protéine G Rab3, recrutée au cours du cycle de cette petite GTPase, à la membrane de la vésicule (Arribas et al., 1997). D'autres protéines de la famille des synaptotagmin-like-protéines (slp) possèdent des domaines C2 dégénérés ne contenant pas les résidus aspartate ou glutamate nécessaires à la liaison des ions calcium (Fukuda and Mikoshiba, 2001c). Ces protéines sont pourtant capables de lier les phospholipides. Nous pouvons donc envisager une liaison transitoire de Syt 8 aux membranes. Cette liaison pourrait avoir une fonction de reconnaissance du type des protéines Rab, ou de régulation du transport des vésicules sécrétoires. Syt 8 est en effet capable de lier les inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate par son domaine CB2 (Ibata et al., 1998). Une augmentation transitoire de ces inositol polyphosphate a été démontrée lors de la stimulation des cellules β pancréatiques (Biden et al., 1987). La translocation *in vitro* utilisée dans cette étude permet de visualiser des liaisons qui apparaissent dans un délai de 5 min. Si une liaison transitoire existe entre Syt 8 et les inositol polyphosphates, nous ne pouvons pas la mettre en évidence dans ce type d'expériences.

RÉSULTATS TROISIÈME PARTIE
EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE DE SYT 10, SYT 11 ET SYT 13
DANS LES CELLULES NEUROENDOCRINES

I/INTRODUCTION

Les synaptotagmines sont une famille de protéines contenant 16 isoformes qui contrôlent des étapes distinctes du trafic vésiculaire. Dans les cellules insulino-sécrétoires, toutes les isoformes ne jouent pas le rôle de senseur calcique, probablement tenu par Syt 9 dans les cellules primaires (voir première partie des résultats), ou par Syt 1 et Syt 2 dans les cellules clonales (Lang et al., 1997a). Syt 4, notamment, est présente à proximité du réseau trans de l'appareil de Golgi (Gut et al., 2001), démontrant la présence des Syt dans un compartiment plus précoce de la voie de sécrétion. D'autre part, Syt 6 est retrouvée au niveau de la membrane plasmique.

Afin de mieux comprendre la distribution des Syt dans les cellules insulino-sécrétoires, nous nous sommes intéressés à des isoformes moins bien connues, dont la localisation et la fonction n'ont pas été décrites : Syt 10, Syt 11 et Syt 13.

La Syt 10 fait partie de la sous famille des Syt regroupant Syt 3, Syt 5 et Syt 6. Cette classe d'isoformes partage des caractéristiques biochimiques communes, comme la capacité de dimérisation par le domaine amino-terminal ou l'incapacité à lier les PIP₂ au niveau du domaine C2B. Syt 10 est pourtant capable de lier les phospholipides et le dimère Syntaxine-SNAP25 de manière dépendante du calcium (Tucker et al., 2003). Les études fonctionnelles *in vitro* d'inhibition de la sécrétion des catécholamines par les cellules PC12 perméabilisées ont également montré que le domaine C2A de Syt 10 possède des caractéristiques biochimiques comparables à celles de Syt 1, senseur calcique de la neurotransmission (Tucker et al., 2003).

La Syt 11 en revanche, fait partie de la même sous famille que Syt 4 (voir figure I20). Ces deux isoformes possèdent en commun un domaine C2A dont le troisième résidu aspartate coordonnant le calcium est substitué par un résidu sérine. Cette modification de la séquence peptidique, au niveau des boucles de ce domaine, modifie les caractéristiques de liaison aux phospholipides dépendante du calcium de Syt 4 (Dai et al., 2004; Fukuda et al., 1996). La protéine Syt 4 reste cependant capable de lier les phosphoinositols polyphosphates de manière dépendante du calcium (Fukuda et al., 1996).

La Syt 13, isoforme majoritairement neuronale, possède des caractéristiques structurales et biochimiques particulières. D'une part, elle ne possède pas de domaine

amino-terminal comme les autres membres de la famille. D'autre part, son homologie avec la Syt 1 est principalement portée par son domaine C2A, et dans une moindre mesure par son domaine C2B (Von Poser and Sudhof, 2001). Syt 13 est cependant capable de lier la neurexine I α par son domaine amino-terminal. Elle est aussi capable d'homo-oligomérisation (Fukuda and Mikoshiba, 2001a). Elle n'est pourtant pas capable de lier les phospholipides ou le complexe SNARE de manière dépendante du calcium par son domaine C2A (Rickman et al., 2004b). En effet, les résidus aspartate, caractéristiques des boucles de ce domaine, ne sont pas présents et la coordination du calcium ne peut donc pas s'effectuer (Fukuda and Mikoshiba, 2001a).

Pour l'analyse de la fonction des Syt dans les cellules sécrétoires, deux hypothèses sont envisageables. La première préconise une distribution dépendante du tissu ou du type cellulaire, la deuxième une distribution dépendante du compartiment cellulaire. Afin d'évaluer ces deux hypothèses nous avons cherché à connaître l'expression de ces trois isoformes dans les cellules insulino-sécrétoires. Nous avons ensuite poursuivi par l'étude de la localisation subcellulaire des isoformes exprimées.

II / RÉSULTATS

A / production et caractérisation des anticorps polyclonaux

1 - Production et purification des anticorps

Préalablement à la production des anticorps polyclonaux, un travail théorique de choix de la séquence antigénique a été nécessaire. Nous avons choisi une séquence de 12 acides aminés constituant le peptide antigénique grâce aux critères d'antigénicité selon le modèle de Welling (Welling et al., 1985) et spécifique de l'isoforme au sein de la famille des synaptotagmines et des protéines de mammifères (**figure R3-1**).

Afin d'augmenter la spécificité, les sérums ont été immunopurifiés sur colonne d'affinité portant le peptide couplé. Cette purification nous a permis d'obtenir un anticorps spécifique pour Syt 11 mais n'a pas amélioré le résultat pour Syt 10 et Syt 13.

2 - Test de spécificité des anticorps polyclonaux

Les protéines recombinantes GST-Syt 1 à GST-Syt 13 sont mises en présence des anticorps dirigés contre Syt 10, Syt 11 et Syt 13 (**figure R3-2B à D**). Pour chacun des anticorps, le signal obtenu montre une absence de réaction croisée avec les Syt 1 à Syt 13 et chaque anticorps reconnaît la protéine recombinante portant la séquence peptidique contre laquelle il doit réagir. Le signal obtenu avec un anticorps anti-GST montre la quantité relative des protéines recombinantes (**figure R3-2A**).

Pour confirmer la spécificité de l'anticorps immunopurifié produit contre Syt 11, nous avons testé le déplacement de la liaison entre l'anticorps et la protéine endogène fixée sur une membrane (**figure R3-2E**) par compétition avec le peptide antigénique. Les protéines des surnageants post-nucléaires de cellules insulino-sécrétoires de hamster (HIT-T15) ou de souris (MIN6) et les cellules de pheochromocytome de rat (PC12) sont mises en contact avec les anticorps préalablement incubés, ou non, avec le peptide spécifique. L'anticorps anti-Syt 11ip reconnaît une protéine unique dont la taille apparente est inférieure à 80 kDa. En présence de 50 μ M de peptide antigénique, on observe un déplacement de la liaison et la disparition du signal correspondant à

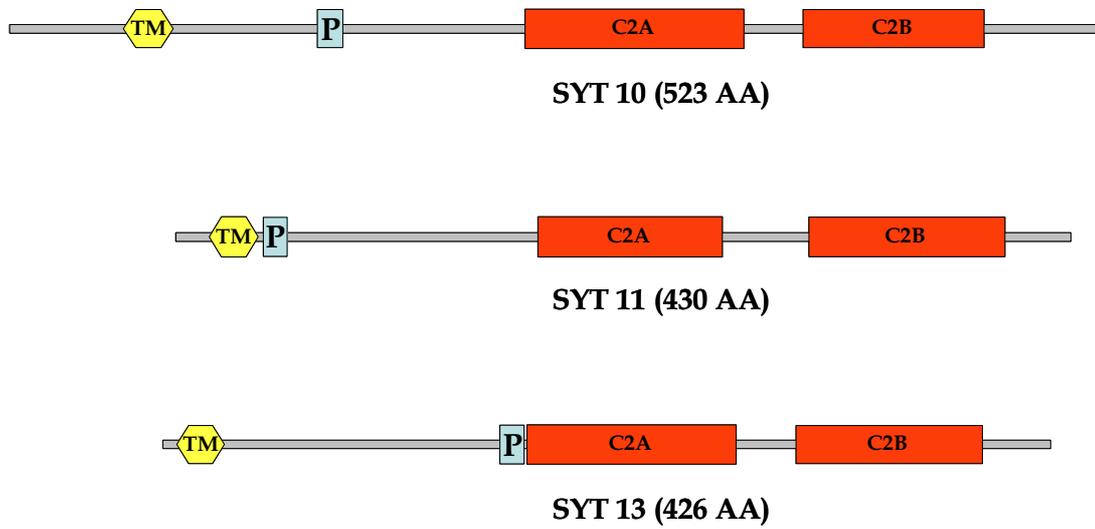


Figure R3-1 : Position des séquences antigéniques choisies pour les anticorps polyclonaux

Les isoformes Syt 10, Syt 11 et Syt 13 sont représentées, le domaine transmembranaire est indiqué (TM) ainsi que les deux domaines C2 (C2A et C2B). La position des séquences antigéniques de 12 acides aminés choisie est indiquée en bleu (P).

Syt 11. Nous n'avons pas pu obtenir de résultats concluants pour le déplacement du signal avec les anticorps non-immunopurifiés dirigés contre Syt 10 et Syt 13.

B / Syt 10, Syt 11 et Syt 13 ne sont pas des protéines ubiquitaires

1 - Syt 10 n'est pas exprimée dans les cellules clonales mais dans les cellules primaires endocrines

L'expression de la protéine Syt 10 dans les cellules insulino-sécrétoires, dans les cellules PC12 et dans le cerveau de rat et de souris, a été déterminée par western blot. Aucun signal n'est détectable avec le sérum anti-Syt 10 pour ces cellules ou ces tissus. Pourtant, nous avons détecté une protéine de taille apparente de 60 kDa dans les cellules des îlots pancréatiques de souris, ou inférieure à 70 kDa dans les cellules chromaffines, compatibles avec la taille théorique attendue de 59 kDa (**figure R3-3A**).

Afin de déterminer si le niveau d'expression de cette protéine dans les cellules MIN6 n'était pas simplement inférieur à notre capacité de détection en western blot, nous avons cherché à amplifier la séquence codante pour le domaine cytoplasmique de la protéine à partir de l'ARNm. La transcription inverse, suivie d'une amplification, (**figure R3-3B**) montre la présence de l'ARNm de Syt 10 au niveau nucléotidique dans le cerveau de souris mais pas dans les cellules MIN6.

L'absence de signal obtenu en western blot dans les homogénats de cerveau est cependant en contradiction avec les études précédentes établissant Syt 10 comme une isoforme majoritairement neuronale (Babity et al., 1997). Toutefois, toutes les zones du cerveau n'expriment pas cette protéine de façon équivalente. L'hippocampe étant une région où Syt 10 a été détectée (Babity et al., 1997), nous avons testé son expression en immunofluorescence sur les neurones d'hippocampe en culture. L'image obtenue (**figure R3-4A**) montre un marquage de type granulaire présent dans les extensions axonales et dendritiques et, de façon moins prononcée, dans le corps cellulaire. Ce marquage granulaire est également retrouvé dans les cellules des îlots, quelque soit le type cellulaire marqué, et chromaffines primaires (**figure R3-4B et C**).

Syt 10 est donc présente dans les cellules primaires chromaffines et β pancréatiques. Elle est également présente dans le cerveau et notamment dans l'hippocampe.

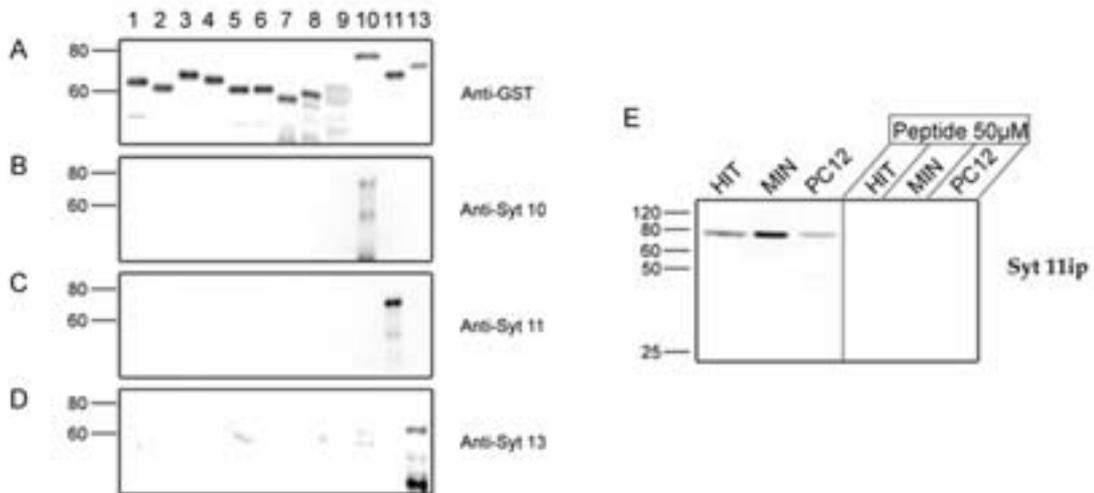


Figure R3-2 : Spécificité des anticorps polyclonaux

Immunodétection des protéines recombinantes GST-Syt 1 à GST-Syt 13 avec les anticorps dirigés contre la GST (A), Syt 10 (B), Syt 11 (C) et Syt 13 (D).

La spécificité de l'anticorps est contrôlée par l'inhibition du signal en présence du peptide antigénique (E). Les homogénats de cellules HIT-T15, MIN6 et PC12 sont incubés avec l'anticorps anti-Syt 11ip en présence, ou non, de 50 μM de peptide.



Figure R3-3 : Syt 10 est exprimée dans les cellules β pancréatiques et chromaffines primaires

(A) L'anticorps anti-Syt 10 révèle dans les cellules β pancréatiques une protéine de taille apparente de 60 kDa, et inférieure à 70 kDa dans les cellules chromaffines. (B) Amplification de l'ADNc de cerveau de souris et des MIN6 pour Syt 10. Aucun fragment n'est détecté lorsque l'amplification est réalisée sur l'ADNc des MIN6.

2 – Syt 11 et Syt 13 sont exprimées dans les cellules insulino-sécrétoires et le cerveau

Contrairement à Syt 10, nous avons pu mettre en évidence les deux protéines Syt 11 et Syt 13, non seulement dans le cerveau, mais également dans les cellules insulino-sécrétoires HIT-T15 et MIN6 et les cellules PC12 (**figure R3-5**). L'anticorps anti-Syt 11 révèle une protéine de taille apparente supérieure à 70 kDa (**figure R3-5A**), bien supérieure à la taille théorique attendue de 48 kDa. Cette différence pourrait refléter des modifications post-traductionnelles. Un signal de plus faible intensité de taille apparente supérieure à 120 kDa est observé dans les homogénats de MIN6. Cette forme de Syt 11 pourrait correspondre à un dimère résistant au SDS (Fukuda et al., 2001a). Pour la même quantité de protéines totales et la même quantité d'anticorps, une exposition 5 fois plus longue est nécessaire à l'obtention d'un signal équivalent dans les homogénats de cerveau. Dans les cellules pancréatiques d'îlot de souris, Syt 11 est présente. Le signal obtenu en immunofluorescence est de type granulaire dans le cytoplasme des cellules positives pour l'insuline et le glucagon des îlots (**figure R3-5A**).

L'anticorps dirigé contre Syt 13 met en évidence plusieurs formes de la protéine dans les différents tissus et cellules (**figure R3-5B**). La bande majoritaire dans les cellules HIT-T15, MIN6 et PC12 se situe à une taille inférieure à 60 kDa. La taille de la protéine ainsi mise en évidence correspond à celle obtenue dans le cas de la surexpression de Syt 10 dans les cellules COS-7 (Fukuda et al., 2001a). Le poids moléculaire apparent est différent du poids théorique déduit de la séquence nucléotidique. Ce résultat suggère à nouveau des modifications de la structure secondaire, voire des motifs qui interfèrent avec la migration électrophorétique. Un second signal est également détecté pour une taille théorique inférieure à 40 kDa. Cette forme courte est la forme majoritaire dans les homogénats de cerveau de rat et de souris. Bien que nous ne puissions pas écarter l'hypothèse de la présence de produits de dégradation, nous pouvons aussi envisager la possibilité de l'expression de différents variants d'épissage comme cela a été décrit pour d'autres isoformes (Craxton and Goedert, 1999).

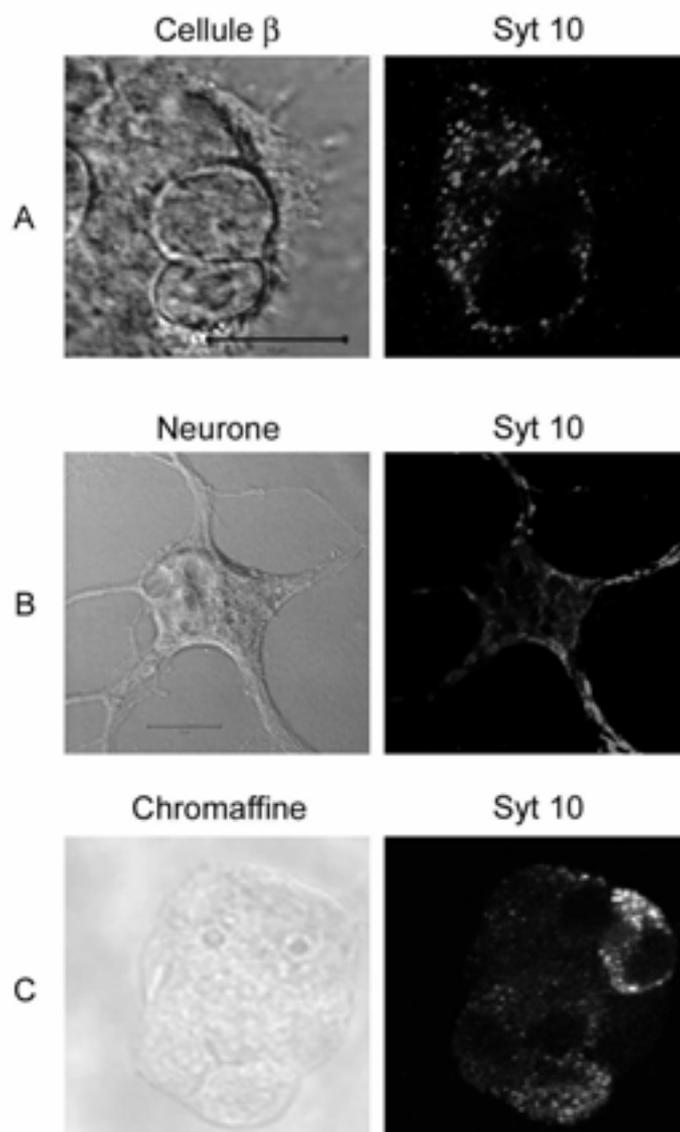


Figure R3-4 : Syt 10 est exprimée dans les cellules β pancréatiques, chromaffines et les neurones d'hippocampe

Immunofluorescence effectuée sur les cellules β pancréatiques de souris (A), les neurones d'hippocampe embryonnaire de rat en culture (B) et les cellules chromaffines de bœuf (C). Le sérum anti-Syt 10 met en évidence un signal granulaire dans les trois types de cellules. Barre de taille : 10 μ m.

Les cellules β et α pancréatiques expriment Syt 13. Le signal obtenu en immunofluorescence montre une distribution de type granulaire (**figure R3-5B**) présente dans l'ensemble du cytoplasme.

Les isoformes Syt 11 et Syt 13 étant présentes dans les cellules insulino-sécrétoires MIN6, nous avons poursuivi la caractérisation de la localisation de ces deux isoformes dans ces cellules par un fractionnement sur un gradient continu de saccharose.

C / Localisation subcellulaire de Syt 11 et Syt 13 par fractionnement des cellules MIN6 sur un gradient continu de saccharose

Les cellules MIN6 sont soumises à un fractionnement sur un gradient continu de saccharose. Les différentes fractions ont été ensuite analysées pour leur concentration en protéines totales, en insuline ou leur concentration en saccharose (**figure R3-6A**). La répartition des marqueurs des organelles est également analysée par immunodétection et quantifiée (**figure R3-6B**). La répartition est la même que celle décrite dans la première partie des résultats (**figure R1-3**).

Comme en témoigne la figure **R3-8C**, la Syt 11 est majoritairement présente dans les fractions 8 à 11, correspondant à une concentration de saccharose comprise entre 1 et 1,5 M. Cette distribution recouvre celle de la calréticuline, protéine résidente du réticulum endoplasmique (RE), mais aussi celle des granules sécrétoires contenant l'insuline. La distribution de Syt 13 est très différente (**figure R3-6B**), elle se situe dans les fractions de faible concentration de saccharose (0,4 à 0,8 M), et est compatible avec un compartiment de faible densité. Ce compartiment est différent de celui des microvésicules de type synaptiques (synaptic like microvesicles, MVTs) qui sont principalement présentes à de plus fortes densités (0,8 M de saccharose).

D / Localisation subcellulaire de Syt 11 dans les cellules MIN6

Le fractionnement des cellules MIN6 sur un gradient continu de saccharose a montré une distribution de Syt 11 compatible avec le RE ou les vésicules sécrétoires.

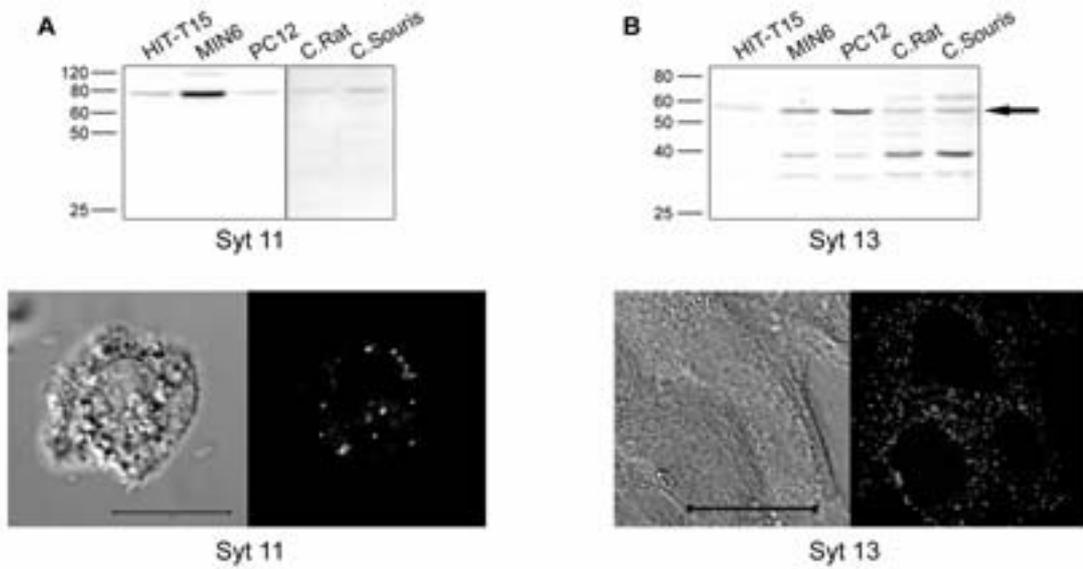


Figure R3-5 : Syt 11 et Syt 13 sont exprimées dans les cellules insulino-sécrétoires β pancréatiques, HIT-T15 et MIN6, les cellules PC12 et le cerveau

A : En immunodétection, une bande majoritaire est détectée pour Syt 11 correspondant à une taille apparente de plus de 70 kDa. En immunofluorescence sur les cellules des îlots de souris, un signal granulaire est observé. **B :** En western blot, plusieurs bandes sont détectées pour Syt 13 dans les différents tissus et cellules testés. En immunofluorescence sur les cellules des îlots de souris, un signal granulaire est observé. Barre de taille 10 μm pour A et 20 μm pour B.

Afin de trancher sur cette répartition, nous avons effectué une localisation subcellulaire de Syt 11 dans les cellules MIN6 par immunofluorescence.

1 - Syt 11 n'est pas localisée sur les vésicules sécrétoires dans les cellules MIN6 et PC12

Le marquage correspondant à Syt 11 dans les cellules MIN6 peut être décrit comme granulaire, réparti dans l'ensemble du cytoplasme. L'étude de la colocalisation réalisée en immunofluorescence sur les cellules insulino-sécrétoires et les cellules PC12 montre une répartition très différente de Syt 11 et les marqueurs des vésicules sécrétoires contenant l'insuline et la chromogranine (**figure R3-7A et B**).

2 - Syt 11 est partiellement colocalisée avec ERGIC-53 et β -COP.

Les résultats obtenus avec le fractionnement des cellules MIN6 sur gradient continu de saccharose ainsi qu'en immunofluorescence sur les neurones d'hippocampe tendent à la conclusion de la présence de Syt 11 sur un compartiment précoce de la voie de transport et de sécrétion. Nous avons donc cherché à comparer la répartition subcellulaire de cette isoforme et des marqueurs de la voie de transport dans les cellules MIN6.

Nous avons ainsi utilisé un marqueur du compartiment intermédiaire ERGIC-53 (Schweizer et al., 1993), du transport rétrograde β -COP (sous-unité de l'hétéro-oligomère COPI) et de l'appareil de Golgi, G58K. Pour l'ensemble de ces trois protéines nous ne retrouvons pas de colocalisation stricte avec Syt 11 (**figure R3-8**). Cependant, le signal obtenu avec Syt 11 et ERGIC-53 ou avec β -COP montre une colocalisation partielle. Syt 11 pourrait donc se situer à proximité du compartiment intermédiaire ou des vésicules de transport rétrograde entre l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique.

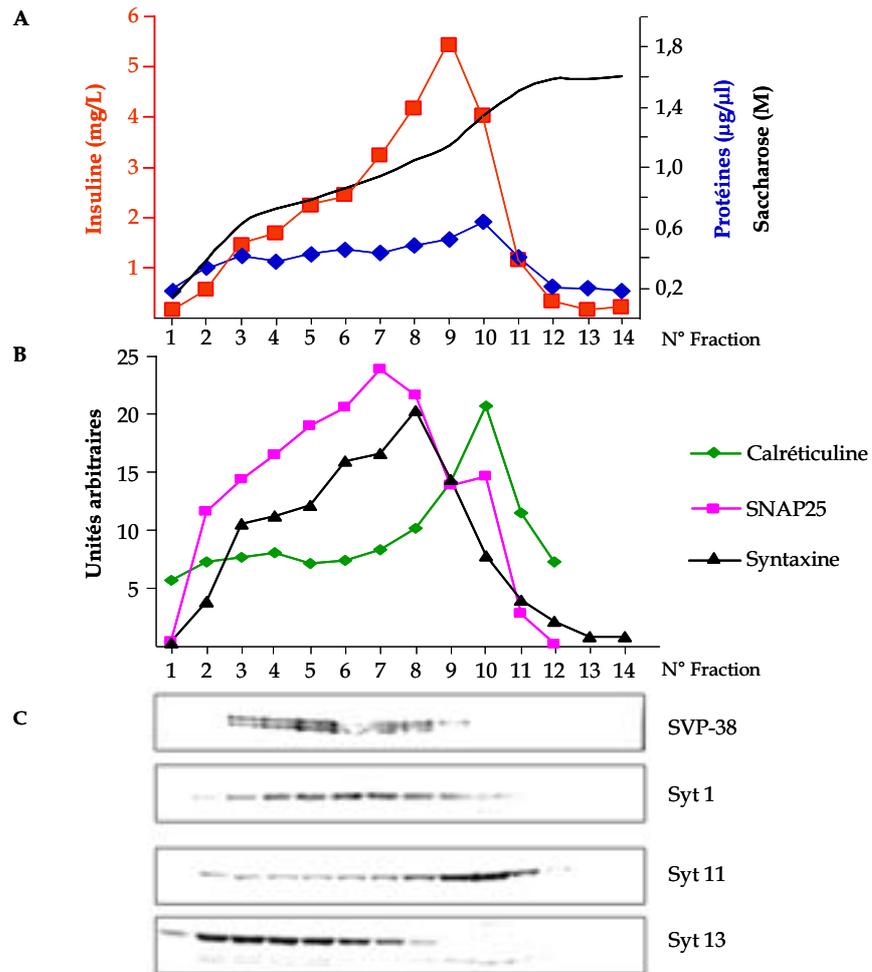


Figure R3-6 : Répartition sous cellulaire des isoformes des synaptotagmines dans les cellules MIN6 après fractionnement sur un gradient continu de saccharose.

A : Quantification de la concentration en saccharose, la concentration en protéines totales et en insuline de chaque fraction. **B** : Quantification densitométrique du signal d'immunodétection obtenu avec les anticorps anti-calréticuline, anti-SNAP25 et anti-syntaxine. **C** : Répartition sur les différentes fractions de la synaptophysine (anti-SVP38), de la Syt 1 et des isoformes Syt 11 et Syt 13.

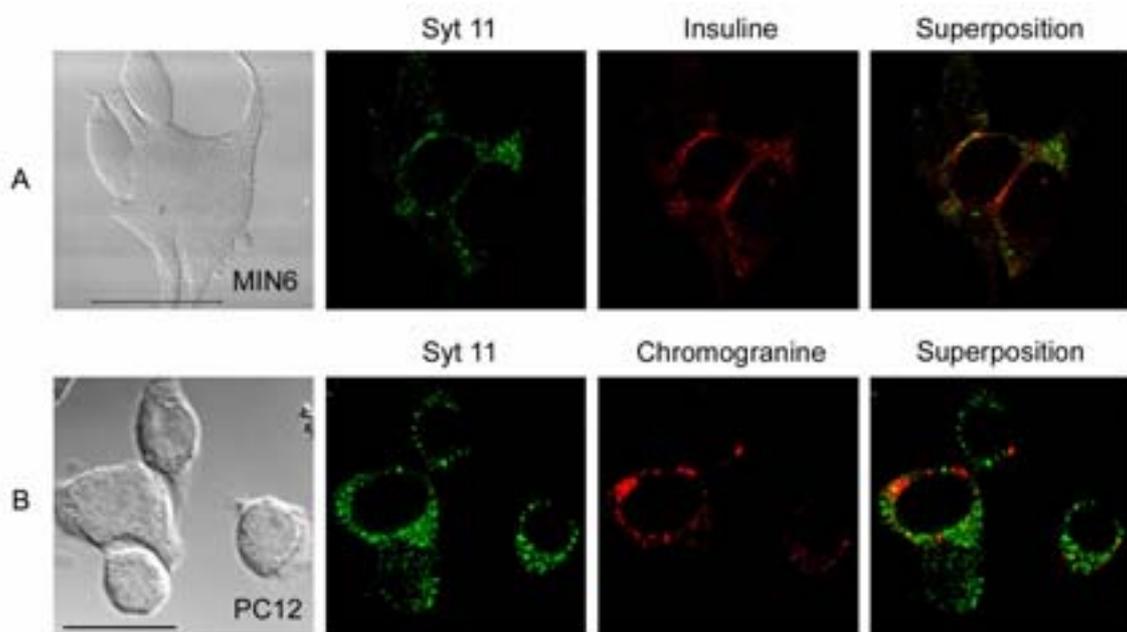


Figure R3-7 : Syt 11 n'est pas co-localisée avec les marqueurs des vésicules sécrétoires dans les cellules MIN6 et PC12

Immunofluorescence effectuée sur les cellules MIN6 et PC12. (A) Syt 11 n'est pas présente sur les granules contenant l'insuline dans les cellules MIN6. (B) Syt 11 n'est pas co-localisée avec la chromogranine dans les cellules PC12. Barre de taille : 10 μm pour A et 20 μm pour B.

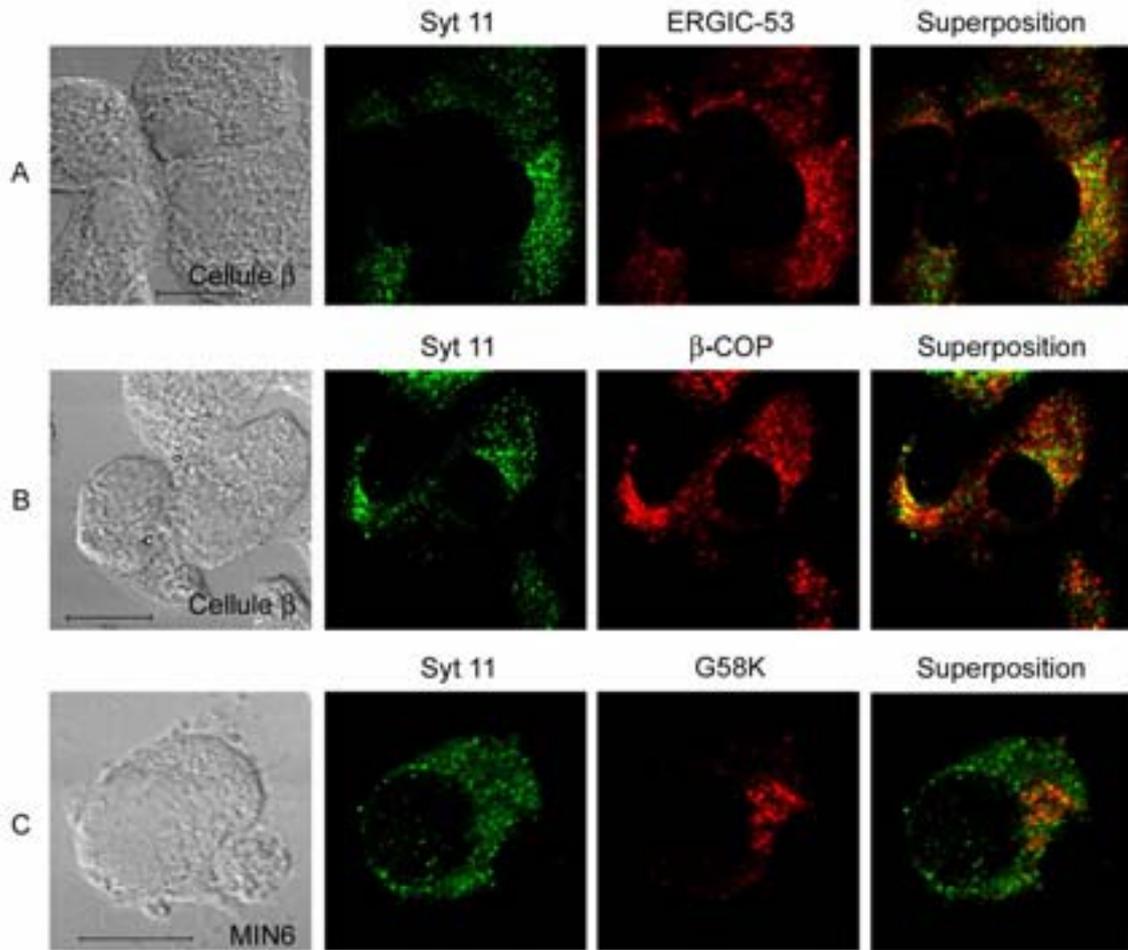


Figure R3-8 : Syt 11 est partiellement co-localisée avec les marqueurs du compartiment intermédiaire ou du transport rétrograde mais pas de l'appareil de Golgi
Immunofluorescence effectuée sur les cellules β pancréatiques de souris ou MIN6. (A) : Syt 11 co-localise partiellement avec ERGIC-53, marqueur du compartiment intermédiaire. (B) : Syt 11 est partiellement co-localisée avec β -COP, marqueur des vésicules à COPI du transport rétrograde (C) Syt 11 n'est pas colocalisée avec G58K, marqueur de l'appareil de Golgi. Barre de taille : 10 μ m.

III / DISCUSSION ET CONCLUSIONS

La production des anticorps spécifiques des isoformes Syt 10, Syt 11 et Syt 13 nous ont permis de déterminer la distribution de ces synaptotagmines dans les cellules insulino-sécrétoires, chromaffines et les neurones d'hippocampe. Nous avons pu également mettre en évidence une différence d'expression des isoformes dans les cellules neuroendocrines.

Syt 10, présente dans les cellules β primaires et chromaffines, n'est pas détectée dans les lignées clonales ou les homogénats de cerveau. La présence spécifique de Syt 10 dans les neurones d'hippocampe en culture est cohérente avec l'expression différentielle observée dans les zones différentes du cerveau, et principalement dans la zone hippocampique (Babity et al., 1997). De plus, la régulation de l'expression de cette isoforme est sous la dépendance de facteurs de stimulation liés à l'excitotoxicité des cellules neuronales. La faible détection de Syt 10 peut donc également provenir de la nature transitoire de son expression. De même, la faible expression de la forme de 60 kDa de Syt 13 dans les homogénats de cerveau, bien que cette protéine soit décrite comme majoritairement cérébrale (von Poser and Sudhof, 2001), est cohérente avec une expression transitoirement accentuée au cours des stades embryonnaires (Fukuda and Mikoshiba, 2001a).

La localisation de Syt 11, que nous proposons sur un compartiment précoce qui pourrait être le compartiment intermédiaire entre réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, diffère de la localisation proposée par une autre étude (Fukuda et al., 2001a). L'expression transitoire de la protéine Flag-Syt 11 dans les cellules COS-7 montre une distribution de cette isoforme dans un compartiment qui pourrait correspondre à l'appareil de Golgi. Dans notre étude, la distribution de Syt 11, observée grâce au fractionnement des cellules MIN6 sur un gradient continu de saccharose, ne correspond pas à l'appareil de Golgi. Cet organelle est en effet plus couramment retrouvée dans des fractions de densité plus faible que celle correspondant à Syt 11.

Grâce à ce même fractionnement, nous avons observé la présence de Syt 13 dans un compartiment de faible densité. Ce résultat, associé au marquage de type granulaire observé en immunofluorescence, est en accord avec une précédente étude (Fukuda and

Mikoshiha, 2001a). De plus, le recyclage de Syt 13 surexprimé, entre un compartiment intracellulaire et la membrane plasmique, a conduit à proposer un rôle de cette isoforme dans le transport constitutif (Fukuda and Mikoshiha, 2001a). Cette hypothèse est en accord avec la présence de cette isoforme sur des vésicules de faible densité.

Les caractéristiques biochimiques de Syt 10, comparables à celles de Syt 1, pour le domaine C2A du moins (Tucker et al., 2003), en font un senseur calcique putatif, qui pourrait intervenir dans le transport vésiculaire ou la régulation de l'exocytose et de l'endocytose. En effet, cette isoforme est capable de lier les phospholipides et les protéines SNARE de façon dépendante du calcium (Rickman et al., 2004b). A contrario, les propriétés biochimiques Syt 11 et Syt 13 ne sont pas compatibles avec un rôle de senseur calcique car ces deux isoformes ne sont pas capables de lier les phospholipides et les protéines SNARE de façon dépendante du calcium. Il est cependant important de préciser que ces interactions décrites *in vitro* ne sont pas nécessairement représentatives de la capacité de liaison de ces protéines *in vivo*. Une étude récente a notamment montré le lien entre la protéine Parkin et Syt 11. Cette ubiquitine, produit du gène parkin dont la mutation provoque une forme de maladie de Parkinson juvénile (autosomal recessive juvenile parkinsonism), interagit avec Syt 11 et provoque sa dégradation. Une augmentation de la dégradation de Syt 11 par une forme inactive de Parkin provoque une accumulation de Syt 11 dans les corps de Lewy, caractéristiques de la maladie de Parkinson (Huynh et al., 2003).

Le rôle des synaptotagmines ne possédant pas des domaines C2 "typiques" reste encore à élucider. Les études doivent sans doute se tourner vers des fonctions liées au transport ou à la maturation des protéines.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons, dans cette étude, produit et caractérisé des anticorps polyclonaux spécifiques des isoformes Syt 8, Syt 10, Syt 11 et Syt 13. Grâce à ces anticorps nous avons pu établir (1) que l'isoforme Syt 8 peut avoir un comportement biochimique de protéine cytosolique (2) que Syt 10 est exprimée dans les cellules primaires du pancréas endocrine, dans les neurones d'hippocampe ou dans les cellules chromaffines, mais pas dans les lignées clonales insulino-sécrétoires (3) que Syt 11 et Syt 13 sont exprimées dans les cellules insulino-sécrétoires (4) que Syt 11 est localisée, dans les cellules β pancréatiques, dans un compartiment précoce de la voie de sécrétion qui pourrait être le compartiment intermédiaire.

De plus, nous avons mis en évidence une localisation différente de Syt 7 en fonction du type cellulaire. Dans les cellules insulino-sécrétoires, cette isoforme n'est pas localisée sur les VLCD ou la membrane plasmique et ne joue donc pas le rôle de senseur calcique de l'exocytose de l'insuline. En revanche, Syt 9 est localisée sur les VLCD dans ces cellules et pourrait donc jouer le rôle de senseur calcique de la sécrétion d'insuline.

Syt 8 : une protéine cytosolique ?

Le comportement biochimique de protéine cytosolique décrit pour Syt 8 est surprenant pour une théoriquement membranaire. Une des interprétation possible est la présence d'un variant d'épissage ne possédant pas de domaine transmembranaire. Le domaine transmembranaire des Syt est toujours codé par un exon unique qui, comme pour d'autres isoformes comme Syt 6, peut être absent (Fukuda and Mikoshiba, 1999a). Une indication supplémentaire venant appuyer cette hypothèse aurait pu être obtenue par la méthode de RT-PCR à partir des ARNm de MIN6. Nous n'avons cependant pas obtenu de produit d'amplification de la taille attendue par cette méthode, nous n'avons pas non plus été en mesure de cloner la séquence codante complète de Syt 8. Cette absence d'amplification, retrouvée avec plusieurs oligonucléotides différents, peut refléter la faible quantité de transcrit spécifique. Une grande variabilité de l'extrémité 5' des transcrits de Syt 8 a d'ailleurs été prédite par analyse *in silico* (Craxton, 2004). Il existe notamment trois codons start possibles pour la traduction de la protéine dans la zone amino-terminale et un dans le domaine C2A

(Craxton, 2004). Cette variabilité peut perturber l'amplification spécifique. Les EST répertoriés dans les banques de données ne contiennent du reste jamais la séquence codante pour la partie amino-terminale de la protéine. Enfin, le clonage de la séquence codante complète de Syt 8 a été réalisé par une équipe, qui a par ailleurs cloné toutes les autres isoformes par RT-PCR, grâce à la méthode de 5'-RACE (Fukuda et al., 1999b). L'utilisation de cette technique pourrait révéler la difficulté d'amplification des transcrits avec un oligonucléotide spécifique de de l'extrémité 5'.

Un variant d'épissage ne possédant pas de domaine transmembranaire a déjà été décrit pour Syt 6 (Fukuda and Mikoshiba, 1999a). La possibilité d'épissage au niveau de l'exon codant pour le domaine transmembranaire a également été proposée, sur la base de la structure génique, pour Syt 1, Syt 4 et Syt 7 (Craxton and Goedert, 1999). La position des jonctions entre exons et introns sur les gènes des synaptotagmines varie d'une isoforme à l'autre (voir introduction paragraphe D/ 1.1). Cependant, le domaine transmembranaire est toujours codé par le deuxième exon, quelle que soit l'isoforme. Nous pouvons ainsi envisager un mécanisme général d'épissage alternatif du domaine transmembranaire qui pourrait concerner d'autres isoformes. Cet épissage ajoute encore à la diversité des localisations et du comportement biochimique de cette famille de protéine.

Le rôle de telles isoformes solubles reste encore à définir. Une fonction dans le transport vésiculaire est toutefois envisageable, par analogie avec d'autres protéines solubles contenant deux domaines C2. Il existe en effet quatre familles de ce type : les protéines rabphilin-3 (Shirataki et al., 1993), doc2 (Fukuda and Mikoshiba, 2000b), slp (pour synaptotagmin like protein) (Fukuda et al., 2001f) et Tac2-N (Fukuda and Mikoshiba, 2001d).

Afin de mieux comprendre le rôle de ces formes solubles, et plus particulièrement de Syt 8, nous pourrions, à l'aide d'amplification par PCR suivie du séquençage des transcrits étudier l'ensemble des formes présentes. Cette méthode pourra être associée à une immunoprécipitation avec l'anticorps dirigé contre Syt 8 suivi d'un séquençage de la protéine immunopurifiée. Ce séquençage peptidique ne pourra bien entendu pas répondre strictement à la question de la présence du domaine transmembranaire mais pourra confirmer la spécificité de l'anticorps. Dans ce but, l'utilisation de siRNA "small interfering RNA" spécifique de la protéine Syt 8 (la cible est validée par le fournisseur)

pourrait être envisagée. Des études fonctionnelles sur les cellules MIN6 dont l'expression de Syt 8 est inhibée par la méthode de RNAi seraient alors envisageables.

L'obtention d'un anticorps spécifique dirigé contre la protéine Syt 8 va permettre de débiter des études biochimiques de liaison *in vitro* ou *in vivo*. Pour cela, les partenaires protéiques pourront être révélés par des méthodes de pull-down ou de co-immunoprécipitation dans les cellules insulino-sécrétoires. Nous avons également développé au laboratoire une méthode de vidéo-microscopie permettant l'observation *in vivo* de la dynamique de translocation de protéines chimères Syt C2AB-eGFP lors de la stimulation d'une cellule vivante. Cette méthode donne accès à la cinétique de l'interaction des domaines C2 avec les membranes en temps réel. L'utilisation d'une telle technique, avec la protéine Syt 8-eGFP surexprimée, permettra de déterminer si cette isoforme est transitoirement capable de se lier à des structures de type membranaire suite à l'activation des protéines kinases, des phospholipases, des lipides kinases ou phosphatases par exemple.

Syt 7 n'est pas le senseur calcique de l'exocytose de l'insuline

Au cours de cette étude, nous avons par ailleurs démontré une localisation différente de Syt 7 en fonction du type cellulaire. Les différents variants d'épissage exprimés dans les cellules neuroendocrines pourraient avoir des localisations et des fonctions différentes. Afin de mieux comprendre le rôle de chacun de ces variants, nous pourrions tout d'abord affiner la localisation de Syt 7 dans les lignées insulino-sécrétoires. Une localisation au niveau de l'endosome tardif est envisageable. Pour confirmer cette hypothèse, une étude de co-localisation avec des marqueurs spécifiques de ce compartiment, comme Rab 7 ou syntaxine 7 (Nakamura et al., 2000) sera nécessaire. Ce travail a également exclu, par l'intermédiaire de la localisation subcellulaire, la participation de Syt 7 dans les étapes finales de l'exocytose d'insuline. Les effets observés lors de la surexpression de la protéine, ou l'utilisation de la protéine recombinante, peuvent être expliqués par les caractéristiques biochimiques de Syt 7 compatibles avec celles des protéines impliquées dans ces étapes.

Syt 9 est-elle le senseur calcique unique de la sécrétion d'insuline ?

Nous nous sommes également intéressés au senseur calcique de l'exocytose des cellules insulino-sécrétoires. Dans les cellules β pancréatiques primaires, Syt 9 est à ce jour la seule isoforme pour laquelle la distribution subcellulaire recoupe celle de l'insuline. Elle reste donc le meilleur candidat au rôle de senseur calcique de l'exocytose. Pourtant, les études fonctionnelles effectuées sur les cellules HIT-T15, avec les protéines mutantes Flag-Syt 9, n'ont pas permis de montrer strictement l'implication de cette protéine dans les étapes finales de l'exocytose. Dans ces cellules, comme dans les cellules INS-1E, Syt 1 et Syt 2 sont présentes avec Syt 9 sur les VLCD et jouent le rôle de senseur calcique (Lang et al., 1997a). Une situation comparable a été décrite pour les cellules PC12. Bien que l'existence d'une multitude de clones engage à la prudence dans l'interprétation des résultats, Syt 1 a été localisée sur les VLCD. D'autres équipes ont également démontré la présence de Syt 5 et Syt 9, sur les granules sécrétoires (Fukuda, 2004). Il existerait donc 3 isoformes, au moins, sur les granules sécrétoires dans les cellules PC12. Les études fonctionnelles utilisant la technique d'ARN interférence ont pourtant montré que l'inhibition de Syt 9, mais pas celle de Syt 1, dans ces cellules, a un effet sur la sécrétion des catécholamines. Les données biochimiques, tirées des expériences d'inhibition de la sécrétion sur les cellules PC12 perméabilisées, montraient pourtant que les deux isoformes Syt 1 et Syt 9 peuvent jouer le rôle de senseur calcique (Tucker et al., 2003). Enfin, dans les cellules chromaffines de souris, Syt 1 et Syt 9 sont exprimées sur les VLCD. Dans ces cellules, l'ablation de Syt 1 (souris mutante null Syt 1-/-) a un effet drastique sur la fonction de sécrétion des catécholamines, sans que l'étape concernée soit connue (Neher and Penner, 1994).

Le tableau est donc complexe et les effets sont variés (complets ou partiels). Pourtant les résultats évoqués suggèrent plusieurs hypothèses : (1) les isoformes sont localisées sur les mêmes vésicules et doivent interagir les unes avec les autres pour être fonctionnelles (2) les isoformes sont localisées sur les mêmes vésicules mais n'interviennent pas dans les mêmes étapes, (3) certaines isoformes se trouvent sur des granules matures de types différents et/ou enfin (4) certaines isoformes sont

impliquées dans des étapes en aval de la fusion membranaire : l'endocytose et le recyclage (Nicholson-Tomishima and Ryan, 2004).

La diversité des résultats et les effets partiels observés lors de l'inhibition de l'expression de Syt 5 ou de Syt 9, dans les cellules INS-1E, peuvent être expliqués par la capacité d'hétéro-oligomérisation de l'isoforme non inhibée avec Syt 1. Le modèle suivant peut être envisagé : lorsque l'expression de Syt 9 est inhibée, Syt 5 forme des oligomères avec Syt 1, elle est ainsi partiellement capable d'assurer la fonction de senseur calcique. A contrario, dans les cellules chromaffines, n'exprimant que Syt 1 et Syt 9 sur les VLCD, l'élimination complète de Syt 1 (souris mutante null Syt 1-/-) entraîne l'inhibition de la capacité de réponse rapide des cellules. Syt 9, ne pouvant pas former d'oligomères avec Syt 1, n'est pas capable d'assumer seule la fonction de senseur calcique. Ce modèle est appuyé par les résultats partiels obtenus lors de l'inhibition de l'expression de Syt 9 ou de Syt 5 par la méthode d'ARN interférence dans les cellules INS-1E (Iezzi et al., 2004). L'absence d'effet de la surexpression de la protéine Flag-Syt 9 sauvage ainsi que notre incapacité à obtenir un dominant négatif avec la surexpression de la protéine Flag-Syt 9 mutée, est également en faveur d'un modèle excluant un senseur calcique unique. Dès lors, nous pouvons envisager la nécessaire interaction entre les synaptotagmines portées par une même vésicule ou l'intervention des différentes isoformes dans des étapes précises du recrutement ou du recyclage des vésicules. Ces deux hypothèses ne sont pas exclusives l'une de l'autre mais permettent d'expliquer la redondance des isoformes sur un même compartiment. Il serait nécessaire, pour confirmer cette hypothèse, de connaître la capacité d'oligomérisation de Syt 1 et Syt 9 *in vitro* puis *in vivo*. La réticulation obtenue *in vivo* grâce à des agents chimiques formant des liaisons covalentes est une méthode qui permettra, en fonction des conditions de stimulation calcique, de connaître les partenaires protéiques de Syt 9.

Les vésicules sécrétoires matures contenant l'insuline sont habituellement décrites comme constituants de deux compartiments : l'un de réserve et l'autre immédiatement libérable (Rorsman et al., 2000). Cette dichotomie reflète l'aspect biphasique de la sécrétion d'insuline en fonction du temps mais est sans doute une simplification de la réalité biochimique. Les étapes d'acquisition de la compétence à la fusion sont sans doute multiples. Nous pouvons ainsi envisager une multitude de groupes de vésicules

de plus en plus “proches” de l’exocytose. Cette continuité entre les différents stocks de vésicules implique des modifications biochimiques fines qui pourraient être sous la dépendance de la concentration de calcium intracellulaire. Les différentes isoformes interviendraient alors à différentes étapes qu’il nous reste à décrire dans les cellules insulino-sécrétoires.

La distribution et la localisation de Syt 9 étant établie, les études fonctionnelles et biochimiques sur la protéine endogène ou surexprimée sont désormais envisageables. Afin d’analyser la fonction de Syt 9 dans la sécrétion d’insuline par les cellules MIN6, nous avons développé au laboratoire la technique d’ARN interférence. Pour cela, nous avons choisi un oligonucléotide spécifique d’une séquence correspondante à 21 acides aminés du domaine C2B. Cet oligonucléotide a été inséré dans un plasmide d’expression eucaryote qui permet, par transfection transitoire, la diminution de l’expression de la protéine Syt 9 endogène dans les cellules MIN6¹.

Des mesures électrophysiologiques, d’ampérométrie notamment, seraient particulièrement adaptées à l’étude des compartiments de vésicules. Il existe aujourd’hui des électrodes capables de mesurer l’oxydation de l’insuline libérée par les cellules β pancréatiques. Cette technique, développée à Bordeaux en collaboration avec le centre de Recherche Paul Pascal, sera un moyen d’investigation des étapes tardives de la fusion membranaire dans les cellules insulino-sécrétoires. Des mesures de capacitance, autre méthode électrophysiologique qui permet d’étudier les phénomènes d’exocytose, pourraient également y être associées. La localisation des différents types de vésicules, matures ou immatures, pourra également être résolue par des approches de microscopie électronique. De même, le rôle des différentes isoformes dans le recyclage des vésicules et l’endocytose, pourra être confirmé par l’analyse en microscopie électronique.

Afin de mieux comprendre la fonction de Syt 9 dans la sécrétion d’insuline, l’étude des propriétés biochimiques des domaines C2 est à poursuivre. Pour cela, d’autres mutants sont à construire. Il pourrait notamment être intéressant de muter plusieurs résidus aspartate essentiels afin de modifier plus drastiquement la liaison du calcium. Le contrôle de cette liaison est couramment effectué de façon biochimique grâce à la liaison des Syt à des liposomes en présence de calcium. Cependant, cette technique a

¹ Frédéric Boal observations non publiées

montré ses limites lors de la mise en évidence du comportement différent de la protéine native et des protéines recombinantes. Il est donc aujourd'hui nécessaire de connaître l'affinité et la cinétique de liaison *in vivo* des isoformes des Syt, et plus particulièrement de Syt 9, dans les cellules insulino-sécrétoires. Pour cela, nous avons développé au laboratoire une méthode d'analyse *in vivo* de la liaison des Syt aux membranes. Cette technique permet de suivre, par vidéo-microscopie, la protéine chimère Syt 9C2AB fusionnée à l'eGFP qui, en condition basale, se localise dans l'ensemble du cytoplasme et qui, lors d'une stimulation calcique, transloque vers la membrane plasmique. L'utilisation de plusieurs formes de protéines chimères contenant, par exemple, le domaine C2A ou C2B seul fusionné à l'eGFP, permettra d'aborder la cinétique de liaison de la protéine ainsi que la contribution individuelle des deux domaines. Les mutations spécifiques réalisées sur les domaines C2 (D₂N et D_{3,4}N) sont utilisés à ces fins. Ce projet, qui est aujourd'hui poursuivi par Florence Grise, nous a déjà permis de montrer un comportement différent des domaines C2 de Syt 9.

Modèle de localisation de la famille des Syt dans les cellules insulino-sécrétoires

La redondance des isoformes des Syt sur les vésicules sécrétoires est démontrée pour plusieurs lignées ainsi que pour les cellules chromaffines. Pourtant elle ne semble pas exister dans les neurones ou les cellules β pancréatiques primaires. La signification physiologique de cette singularité n'est pas encore connue. Il serait intéressant de comprendre pourquoi des cellules dont la fonction est de répondre à une stimulation calcique par la sécrétion du contenu des vésicules n'ont conservé qu'une seule forme du senseur calcique sur ces vésicules.

Nous avons cherché à clarifier la localisation subcellulaire des isoformes des Syt dans les cellules insulino-sécrétoires. Les isoformes des Syt sont réparties sur des compartiments allant des étapes précoces de la voie de sécrétion à des étapes tardives du recyclage. Cette distribution suggère la présence d'une isoforme pour chaque étape du transport vésiculaire. En nous basant sur les résultats obtenus au cours des études

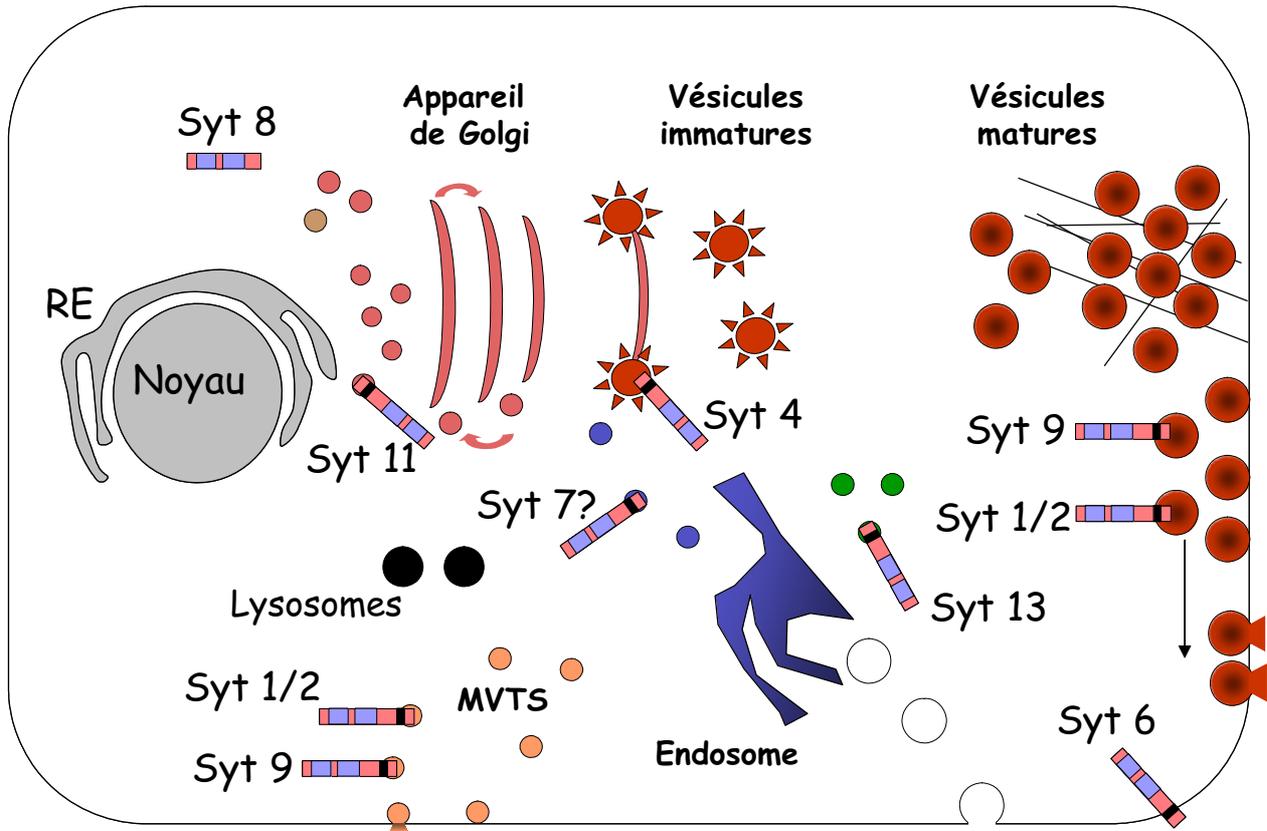


Figure C1 : Schématisation de la localisation envisagée pour les Synaptotagmines dans une cellule insulino-sécrétoire type.

Les isoformes Syt 1 et Syt 2 sont présentes sur les VLCD uniquement dans les lignées clonales INS-1E et HIT-T15, dans les cellules MIN6, Syt 1 est localisée au niveau des MVTS. Notre étude a pu mettre en évidence la localisation de Syt 9 sur les VLCD et probablement sur les MVTS et de Syt 11 sur le compartiment intermédiaire. Nous proposons une localisation de Syt 7 au niveau de l'endosome tardif et de Syt 13 sur des vésicules de faible densité.

précédentes ou au cours de ce travail, nous pouvons proposer un modèle de distribution subcellulaire des différentes isoformes.

Dans ce modèle, Syt 11 est l'isoforme caractérisant le compartiment le plus précoce, et pourrait se situer au niveau du compartiment intermédiaire. Plus tard dans la voie de sécrétion, Syt 4 est localisée à proximité du réseau trans de l'appareil de Golgi (Gut et al., 2001) et Syt 9 sur les granules matures, les VLCD. Syt 6 est située sur la membrane plasmique (Butz et al., 1999) alors que nous proposons la présence de Syt 7 sur le compartiment endosomal et Syt 13 sur des vésicules légères qui pourraient être des vésicules de transport (figure C1).

Pour compléter ces résultats, des études de comarquage nécessaires à la définition plus précise du compartiment impliqué devront être engagées. Nous pouvons également envisager une immunopurification des vésicules grâce à l'anticorps dirigé contre Syt 13. Cette méthode nous permettra, par des analyses biochimiques, de caractériser plus précisément ce compartiment. Enfin, l'utilisation de marqueurs spécifiques de voies de transport différentes de celle de l'insuline (VSV-G ou phosphatase alcaline soluble) pourra être utilisé pour analyser la fonction de Syt 11 mais aussi de Syt 13. Nous avons d'ores et déjà débuté l'étude de la fonction de Syt 11, dans les cellules insulino-sécrétoires, suite à l'inhibition de son expression par la méthode d'ARN interférence. Les petits ARN dessinés sont spécifiques de la protéine Syt 11. Nous observons une inhibition de son expression dans le cas d'une surexpression mais aussi de la protéine endogène. La production et la caractérisation de l'anticorps spécifique de cette isoforme nous ont permis de débiter les études fonctionnelles.

En conclusion, ce travail a permis de caractériser plus précisément la distribution des isoformes des Syt dans les cellules insulino-sécrétoires. Grâce aux anticorps spécifiques et au travail de localisation nous avons ouvert la voie des études fonctionnelles de cette famille de protéine qui semble impliquée dans plusieurs étapes du transport vésiculaire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I / MATERIEL

A / Lignées cellulaires

Les cellules MIN6 lignée clonale dérivée d'un insulinome de souris obtenu par transformation par le virus SV40 (Miyazaki et al., 1990).

Les cellules HIT-T15 lignée clonale dérivée d'un insulinome de hamster obtenu par transformation par le virus SV40, disponible à la collection américaine de cellules ATCC (N° CRL-1777).

Les cellules de pheochromocytome de rat PC12, dérivées d'un chromocytome de rat, numéro CRL-1721 à la collection américaine ATCC.

B / Bactéries

Deux souches de bactéries *Escherichia coli* (Stratagene) ont été utilisées:

La souche Xl1 blue, spécialisée dans l'amplification plasmidique dont le génotype est : recA1, endA1, gyr96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, F'[proAB+, lacIq, lacZdM15, Tn10 (Tetr)].

La souche BL21 (DE3) développée pour l'expression des protéines recombinantes dont le génotype est : B, F-, ompT, hsdSB(rB-mB), gal, dcm, (DE3) pLysS.

C / Animaux

Les animaux utilisés pour la préparation des cellules primaires ou des homogénats de cerveaux ont été fournis par les équipes avec lesquelles nous avons collaboré. La préparation des cellules primaires pancréatiques, des homogénats ou des ARN totaux de cerveau de souris a été réalisée avec des souris males Swiss OF-1 (Charles River, Les Oncins, France). Les homogénats de cerveau de rat et les neurones d'hippocampe en culture ont été préparés à partir de rats Sprague Dawley (Janvier, Le Genest St Isle, France).

D/ Anticorps

Les anticorps primaires et secondaires utilisés en immunofluorescence et en immunodétection sont récapitulés dans les deux tableaux M1 et M2.

Tableau M1 : Anticorps primaires utilisés en immunofluorescence.

Sont indiquées dans le tableau les concentrations des anticorps primaires et secondaires utilisés en immunofluorescence. Les anticorps secondaires sont couplés à un fluorophore : Cyan3 pour les anticorps anti-IgG de souris, Alexa488 pour les anti-IgG de lapin et Texas Red pour les anti-IgG de cochon d'inde.

Antigène	Type	Espèce	Concentrations		Fournisseur
			Primaire	Secondaire	
Syt 7	Polyclonal	Lapin	1 :1000	1 :100	Synaptic System
Syt 9	Monoclonal	Souris	1 :100	1 :300	BD Biosciences
Insuline	Monoclonal	Souris	1 :1000	1 :300	Sigma
Insuline	Polyclonal	Cochon d'inde	1 :500	1 :300	Biodesign
Chromogranine	Monoclonal	Souris	1 :500	1 :300	Dr ML Malosio
Chromogranine	Polyclonal	Lapin	1 :500	1 :300	Dr R Burgoyne
Récepteur	Monoclonal	Souris	1 :1000	1 :300	Dr A Hémar
Transferrine					
LAMP-1	Monoclonal	Souris	1 :4	1 :300	Dr ML Malosio
Ti-VAMP	Monoclonal	Souris	1 :500	1 :300	Dr T Galli
ERGIC-53	Monoclonal	Souris	1 :500	1 :300	Dr HP Hauri
G58K	Monoclonal	Souris	1 :500	1 :300	Sigma
β -COP	Monoclonal	Souris	1 :500	1 :300	Sigma

Tableau M2 : Anticorps primaires utilisés en immunodétection

Sont indiquées dans le tableau les concentrations des anticorps primaires et secondaires. Les anticorps secondaires sont couplés à la peroxydase (HRP, Amersham).

Antigène	Espèce	Concentrations		Fournisseur
		Primaire	Secondaire	
Syt 1	Souris	1 :2000	1 :5000	Synaptic System
Syt 1/2	Lapin	1 :5000	1 :5000	Lang et al., 1997
Syt 7	Lapin	1 :5000	1 :5000	Synaptic System
Syt 9	Souris	1 :500	1 :1000	BD
Calréticuline	Lapin	1 :20 000	1 :5000	Stressgene
SNAP-25	Souris	1 :5000	1 :5000	Strenberger
Syntaxine 1 (HPC-1)	Souris	1 :3000	1 :5000	Sigma
Synaptophysine (SVP38)	Souris	1 :5000	1 :5000	Sigma

II / METHODES

A / Clonage des séquences codantes des Syt et mutagenèse dirigée

1 - Préparation des ARN totaux

Les ARN totaux sont isolés à partir de cerveau de souris et de MIN6. L'extraction et la purification sont réalisées par action combinée du Trizol (Invitrogen) et du chloroforme, suivie d'une précipitation à l'isopropanol. Le tissu ou les cellules sont homogénéisés dans la solution de Trizol à raison de 7 ml pour 500 mg de tissu ou 1 ml pour 10 cm² de culture. Une centrifugation à 12 000 g pendant 15 min à 4°C permet d'éliminer les débris cellulaires. La solution est ensuite incubée 5 min à température ambiante avec 0,2 ml de chloroforme par ml de Trizol utilisé au départ puis centrifugée à 12 000 g pendant 15 min à 4°C. La phase aqueuse supérieure, qui contient l'ARN, est prélevée et 0,5 ml d'isopropanol par ml de trizol, sont ajoutés. La précipitation de l'ARN est réalisée par une centrifugation à 12 000 g pendant 10 min à 4°C. Le culot est rincé à l'éthanol 75% et repris dans 30 µl d'eau **DEPC**¹. La concentration en ARN de la solution est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm. L'intégrité des ARN est également contrôlée par migration électrophorétique sur gel à 1% d'agarose dans un tampon TAE.

2 - Transcription inverse

L'ARN (1 µg) et 0,5 µg d'oligo(dT)₁₅ sont mélangés et dénaturés par une incubation à 70°C pendant 5min. La transcription reverse se fait ensuite dans le tampon de l'enzyme, en présence de 3 mM de MgCl₂, 0,5 mM de dNTP, 1 µl d'enzyme ImPromII™ Reverse Transcriptase (Promega). L'hybridation des oligonucléotides sur l'ARN se fait à 25°C pendant 5 min, la transcription à 40°C pendant 60 min et enfin la dénaturation de l'ARN après transcription à 70°C pendant 15 min.

¹ La composition des solutions indiquées en caractère gras est détaillée en annexe 1.

Tableau M3 : Amplification des séquences codantes pour les fragments cytoplasmiques des Syt 9 à 13

Sont indiqués la source de l'ADNc utilisé, oligonucléotides sens (S) et antisens (AS) ainsi que les sites de restriction, soulignés, qui y sont associés.

Oligonucléotides pour amplification et les sites de restriction qui y sont associés

Syt 9	48-386	Cerveau de souris	S	5'- <u>AGGATCCTTCTGTCTCTACCGGAAGCG</u> -3'	BamHI EcoRI
			AS	5'- <u>AGAATTCTCAGGGTGCAGGTATTGGC</u> -3'	
Syt 9	1-386	Cerveau de souris	S	5'- <u>AGGATCCACGCCATGTTCCCGGAACC</u> -3'	BamHI EcoRI
			AS	5'- <u>AGAATTCTCAGGGTGCAGGTATTGGC</u> -3'	
Syt 10	92-523	Cerveau de souris	S	5'- <u>AGCGGATCCAACCTCAGTGTCTTCC</u> -3'	BamHI EcoRI
			AS	5'- <u>AGCGAATTCTTATGGTGTGGACGGTGGC</u> -3'	
Syt 11	36-430	EST AA050913	S	5'- <u>GAAGATCTGTGTGGACGTGCTGCCACCAGCAGGC</u> -3'	BglII EcoRI
			AS	5'- <u>TCGAATTCCGTA</u> CTCGCTCAGACTGTGCCACTTGGC-3'	
Syt 13	68-426	MIN6	S	5'- <u>ACGGATCCACGGAGCCTGTCCAGC</u> -3'	BamHI EcoRI
			AS	5'- <u>AGCGAATTCTACAGGTGCAGTTGGTGCC</u> -3'	

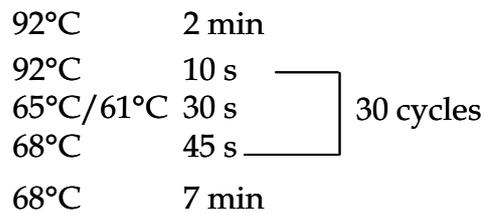


Figure M1 : Conditions de PCR pour l'amplification des séquences codantes pour Syt 9 à 11 et Syt 13.

3 - Amplification des séquences spécifiques

L'amplification des séquences codantes pour les fragments cytoplasmiques des Syt 9 à 13 ainsi que la séquence codante pour Syt 9 est réalisée à partir de l'ADNc de cerveau de souris ou de MIN6 ou encore à partir d'un EST par Polymerase Chain Reaction (PCR). Les différents oligonucléotides utilisés pour l'amplification, la source de l'ARN amplifié ainsi que les sites de restriction associés sont indiqués dans le tableau M3.

La PCR est réalisée dans le tampon de l'enzyme en présence de 350 μ M de chaque dNTP, 3,5 U du mélange d'enzyme comprenant de la *Taq* et de la *Pfu* polymérase (Long Expand Template, Roche), 0,3 μ M de chaque oligonucléotide, et 1,75 mM de $MgCl_2$, dans un volume final de 50 μ l. Les conditions de la réaction de PCR sont comparables pour toutes les séquences amplifiées, seule la température d'hybridation de la paire d'oligonucléotides change : 61°C pour Syt 9, 65°C pour Syt 10, 11 et 13 (figure M1).

4 - Séparation des fragments d'ADN sur gel d'agarose

Les fragments de PCR sont analysés sur un gel d'agarose avant purification. Les gels sont constitués de 0,8% d'agarose dans un tampon TBE contenant 200 μ g/L de bromure d'éthidium (BET). Le champ électrique de 50V appliqué permet la migration des fragments d'ADN en fonction de leur taille. La visualisation des fragments d'ADN couplés au BET se fait ensuite sur une plaque projetant des UV à une longueur d'onde de 302 nm.

La purification des fragments de PCR est réalisée sur colonne d'affinité selon les recommandations du fournisseur (Promega).

5 - Ligature des fragments d'ADN

Le fragment de PCR purifié est ligaturé dans le plasmide de clonage pGEMT grâce à la T4 DNA ligase (Roche). 5 U d'enzyme sont utilisées pour ligaturer le fragment de PCR dans 100 ng de plasmide pGEMT. La quantité de fragment de PCR nécessaire à la réaction est calculée en fonction de sa taille en conservant un rapport 3 :1 en faveur du fragment court. La réaction se fait pendant la nuit à 4°C.

6 - Préparation des bactéries compétentes

Pour permettre l'entrée de l'ADN, la paroi des bactéries est fragilisée par l'action du chlorure de calcium CaCl_2 . Un clone isolé sur milieu solide **LB-Agar** est utilisé pour ensemençer une préculture de 3 ml de LB jusqu'à la phase stationnaire. Cette préculture est diluée dans 50 ml du même milieu liquide, pour obtenir une densité optique à 600 nm (DO_{600}) de 0,05. Lorsque la culture atteint une DO_{600} de 0,6, les bactéries sont centrifugées à 5000 g pendant 5 min à 4°C et resuspendues dans 10 ml d'une solution de CaCl_2 (100 mM) à 4°C et incubées 30 min à 4°C. Cette solution est à nouveau centrifugée à 5000 g pendant 5 min à 4°C et reprise dans 2 ml de CaCl_2 à 4°C. Les bactéries thermo-compétentes ainsi obtenues sont conservées à -80°C en présence de 20% de glycérol.

7 - Transformation des bactéries

Les bactéries sont transformées par choc thermique : le produit de ligation est mis en présence de 200 μl de bactéries préalablement rendues compétentes au CaCl_2 , pendant 40 min à 4°C. Le choc thermique consiste alors en une incubation de 2 min à 42°C puis 2 min à 4°C. La solution bactérienne est maintenue en milieu liquide LB à 37°C pendant une heure, pour permettre l'expression de la résistance à l'antibiotique portée par le plasmide, puis étalée sur un milieu LB solide contenant 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'ampicilline pour la sélection des clones positifs.

8 - Purification de l'ADN à partir de cultures bactériennes

Tous les protocoles d'extraction sont basés sur le principe de la lyse alcaline. Une colonie isolée est utilisée pour ensemençer 50 ml de culture bactérienne (méthode midiprep Qiagen) ou 1,5 ml de culture (méthode miniprep Promega). Les extractions se font suivant les instructions des fournisseurs. La concentration de chaque solution d'ADN est mesurée par l'absorbance à 260 nm.

9 - Séquençage

Les plasmides pGEMT-Syt construits sont vérifiés par séquençage dans les deux sens grâce aux oligonucléotides universels M13 et SP6 par une entreprise spécialisée GenomExpress (Paris).

10 - Construction des plasmides pGEX2T-Syt et pCMVtag2-Syt 9

Les séquences codantes pour les fragments cytosoliques des Syt 9 à Syt 13 contenues dans le plasmide pGEMT sont transférées dans un plasmide pGEX2T, en phase avec la séquence codante pour la Glutathion-S-methyl transférase (GST). La séquence codante pour Syt 9 est transférée dans le plasmide pCMVtag2 en phase avec la séquence codante pour l'étiquette Flag. Pour cela, l'ADN est soumis à digestion par les endonucléases *Bam*HI ou *Bgl*III (voir tableau M3) et *Eco*RI. La réaction est réalisée dans le tampon préconisé par le fournisseur (Roche) pour le couple d'enzyme en présence de 500 ng d'ADN, 0,5 U d'enzyme pendant 1 heure à 37°C. Le fragment d'intérêt est séparé sur un gel d'agarose, purifié et ligaturé dans le plasmide pGEX2T¹ ou pCMVtag2. A nouveau, le plasmide construit est vérifié par séquençage dans les deux sens.

11 - Mutagenèse dirigée

Les mutations sont introduites dans la séquence nucléotidique du plasmide pCMVtag2-Syt 9 par le système " Quick Change Mutagenesis Kit" selon les recommandations du fournisseur (Stratagene). Les oligonucléotides utilisés ainsi que la position des mutations sont détaillés dans le tableau M4. Les mutations introduites sur les protéines qui seront synthétisées à partir de cette séquence concernent un résidu aspartate muté en résidu asparagine : Syt 9-D₂N en position 145, Syt 9-D_{3,4}N en position 330 et 332 et enfin Syt 9-D₂N D_{3,4}N possédant les trois mutations. Pour cette dernière, les mutations sont introduites de façon successive.

La réaction de PCR (Figure M2) est réalisée avec 50 ng d'ADN matriciel, 2,5 U de *Pfu*^{turbo}, 125 ng de chaque oligonucléotide et 500 µM de chaque dNTP, dans un

¹ Les cartes des plasmides construits sont disponibles en annexe.

volume final de 50 μ l. Les plasmides originaux non mutés sont dégradés par l'action de 5U de *dpnI* pendant 1 heure à 37°C.

La séquence est vérifiée par séquençage dans les deux sens à l'aide des oligonucléotides universels T3 et T7.

Tableau M4 : Introduction des mutations dans la séquence codante pour Syt 9.

Sont représentées les séquences des oligonucléotides utilisés pour introduire les mutations sur la séquence codante et la position des acides aminés mutés

Oligonucléotides sens et antisens	
Syt 9 D2N	S 5'-CCTAGGAGGTTCCCTCAGATCCCTATGTTAGTGTCT-3'
	AS 5'-AGACACTAACATAGGGATCTGAGGAACCTCCTAGG-3'
Syt 9 D3,4N	S 5'-CTGACTGTTCTGGATTATGACAAACTGGGGAAGAATGAG-3'
	AS 5'-CTCATTCTTCCCCAGTTTGTCATAATCCAGAACAGTCAG-3'

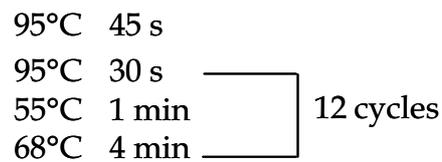


Figure M2 : Conditions de PCR pour l'introduction des mutations sur la séquence codante pour la protéine Flag-Syt 9.

B/ Production et purification des protéines recombinantes

1 - Production des protéines recombinantes

Les bactéries BL21 sont transformées avec les plasmides pGEX2T possédant les séquences codantes pour les fragments cytosoliques des Syt. Un clone isolé sur milieu solide LB-Agar contenant 100 µg/ml d'ampicilline est cultivé dans 3 ml de milieu LB à 37°C pendant la nuit. Le lendemain, la culture en phase stationnaire est diluée pour avoir une DO₆₀₀ de 0,05. Après environ 2 heures, lorsque la DO₆₀₀ atteint 0,4 à 0,5, la production des protéines est induite par 0,4 mM d'IPTG à 37°C pendant 3 heures. La DO₆₀₀ de la culture est alors mesurée et les bactéries sont récoltées par centrifugation à 6800 g pendant 10 min à 4°C. Après deux lavages au **PBS** pH=8 à 4°C, les bactéries sont diluées dans du PBS de manière à obtenir une DO₆₀₀ de 5. Les culots correspondant à 1 ml de cette solution sont congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

2 - Extraction et purification des protéines recombinantes

Pour l'extraction des protéines recombinantes les bactéries sont resuspendues dans 500 µl de **solution de lyse bactérienne** contenant 200 µg/ml de lysozyme. L'incubation de cette solution alternativement dans un bain à 37°C puis un bain d'azote liquide (5 cycles) permet de compléter la cassure enzymatique engagée par le lysozyme. L'ajout de 25 µg/ml de DNase et une brève sonication permettent de casser l'ADN libéré dans la solution. Les débris cellulaires sont éliminés par une centrifugation à 17 500 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est appliqué sur 10 µl de billes de glutathion sépharose 4B (Amersham) pendant la nuit à 4°C. Les billes sont ensuite lavées deux fois avec 200 µl de PBS à 4°C et les protéines recombinantes fixées sont décrochées par application directe de 50 µl de **solution d'échantillon** et chauffage à 95°C pendant 1 min.

C/ Production des anticorps polyclonaux

Pour chaque isoforme des synaptotagmines 8 à 11 et 13, une séquence peptidique de 12 acides aminés est choisie (voir tableau M5). Le choix de la séquence se fait en

fonction de sa capacité antigénique (exemple de profil d'antigénicité de Syt 8 schématisé en figure M3) mais aussi de sa spécificité au sein de la famille des synaptotagmines. Cette séquence est ensuite alignée avec l'ensemble des protéines de mammifères, grâce au programme BLAST. La séquence choisie sera celle correspondant au meilleur compromis entre la capacité antigénique et la spécificité au sein de la famille des synaptotagmines et des protéines de mammifères. A l'extrémité amino-terminale de cette séquence, est ajouté un résidu cystéine qui permettra le couplage du peptide à une colonne d'affinité pour l'immunopurification des sérums.

La synthèse du peptide, ainsi que la production des anticorps, ont été confiées à une entreprise spécialisée (Covalab, Lyon), le protocole général qui est décrit regroupe les informations qui nous ont été fournies.

1 - Production des sérums

Un protocole fourni par la société, concernant l'anticorps anti-Syt 8 est adjoint à titre d'exemple en annexe. Deux lapins (New Zealand White) sont immunisés avec chaque peptide. L'immunisation se fait par une série d'injections du peptide spécifique de chaque isoforme, dissout dans l'adjuvant de Freund. Trois injections intradermiques, puis une injection sous-cutanée, réalisées à 21 jours d'intervalle, constituent la stimulation immunitaire minimale. Les différents sérums sont prélevés 53 jours (J53) puis 74 jours (J74) après la première injection intradermique (J0). La concentration en immunoglobulines des sérums J53 et J74 est comparée avec celle du sérum J0. La capacité de ces sérums à révéler la protéine native en western blot est également testée. En fonction de ces deux critères, d'autres injections sous-cutanées sont administrées, ou non, pour parfaire la réaction immunitaire. Le choix du meilleur sérum pour chaque isoforme est fait en conservant ces deux critères et l'immunopurification est alors réalisée.

2 - Immunopurification

Les anticorps polyclonaux sont purifiés par chromatographie d'affinité. Les peptides sont couplés sur une colonne de sépharose activée. Le sérum (2ml) est mis en présence du peptide pendant 1 heure à 37°C. Après plusieurs lavages de la colonne, les anticorps sont élués par une solution de glycine à pH 2,5. Les fractions contenant les

anticorps immunopurifiés sont rassemblées et la concentration finale en anticorps immunopurifiés est déterminée par lecture de la densité optique à 280 nm. Le titre de chaque solution est mesuré par dosage ELISA.

Tableau M5 : Séquence de chaque peptide utilisé pour la production des anticorps polyclonaux

Séquence des peptides utilisés (code acide aminés à une lettre) pour l'immunisation des lapins, date de prélèvement des sérums en vue de l'immunopurification et concentration de la solution finale d'anticorps immunopurifiés déterminé par la densité optique à 450nm.

	Séquence	Date	Concentration
Syt 8	NH2-CLALQPRLPLLRPR-COOH	J98	35,5 µg/ml
Syt 9	NH2-CVLDKHKQLGRLQY-COOH	J155	151,5 µg/ml
Syt 10	NH2-CALKEHLIKHARV-COOH	J186	95 µg/ml
Syt 11	NH2-CHQQAEEKKHKTPPYK-COOH	J98	126,5 µg/ml
Syt 13	NH2-CKLHFRLDYDQKKA-COOH	J155	40 µg/ml

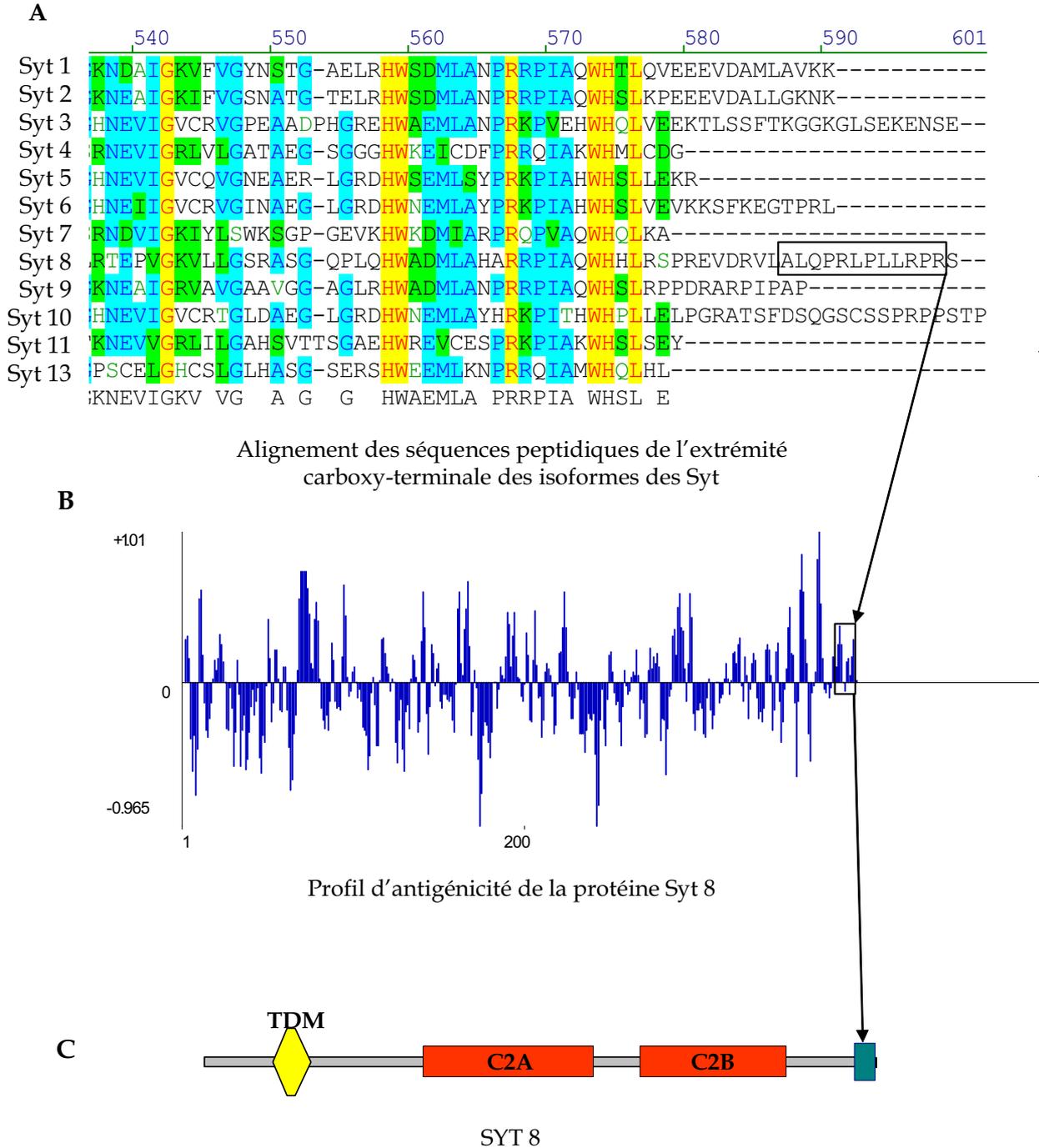


Figure M3 : Choix des séquences peptidiques pour l'immunisation des lapins

A : L'alignement des séquences de l'extrémité carboxy-terminale des isoformes montre une faible homologie.

B : La séquence choisie renferme des acides aminés de bonne antigénicité

C : Position de la séquence antigénique au niveau de l'extrémité carboxy-terminale de Syt 8

D/ Culture cellulaire

Les cellules HIT-T15, MIN6 et PC12 sont ensemencées à une densité permettant d'atteindre la confluence en une semaine, respectivement 3×10^6 , $2,5 \times 10^6$ et $1,5 \times 10^6$ cellules pour 75 cm^2 . La culture est maintenue à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO_2 . Les milieux, dont la composition est détaillée dans le tableau M6, sont renouvelés tous les deux jours et contiennent 50 U/ml de pénicilline et 50 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine.

Tableau M6 : Composition des milieux de culture des lignées cellulaires utilisées.

Abréviations ; SVF : Sérum de veau fœtal, SC : Sérum de cheval. Les cellules HIT-T15 sont cultivées en haut glucose (4,5g/L).

HIT-T15	MIN6	PC12
RPMI 1640 (Gibco 31870)	DMEM (Gibco 41965)	DMEM (Gibco 41965)
10% de SVF	10% de SVF	7% de SVF
0,1 μM d'acide sélénieux	44 mM NaHCO_3	7% de SC
32,5 μM de glutathion réduit	50 μM de β -mercaptoethanol	
2 mM de L-glutamine		

E/ Préparation des extraits cellulaires et tissulaires

1 - Préparation des surnageants post-nucléaires

Les cellules MIN6, HIT-T15 ou PC12, cultivées jusqu'à confluence, sont rincées deux fois au PBS à pH 7,4 sans Mg^{2+} ni Ca^{2+} puis décollées par une incubation de 10 min à 37°C dans une solution de PBS contenant 10 mM d'EDTA. Après une centrifugation à 800 g pendant 5 min, les cellules sont resuspendues dans un **tampon de lyse cellulaire** et cassées par 2 min de sonication.

Les homogénats de tissu cérébral sont préparés à partir d'un rat Sprague Dawley ou de deux souris CD-1. Les animaux sont sacrifiés et décapités, les cerveaux sont isolés, coupés et rincés dans du PBS froid contenant 3 mM de glucose. Les tissus sont

homogénéisés dans du **tampon saccharose** par 10 coups d'homogénéisateur à 1000 rpm.

Les homogénats sont débarrassés des cellules non cassées et des noyaux par une centrifugation à 1000 g pendant 10 min à 4°C. La concentration en protéines totales est quantifiée par un dosage de Bradford (Pierce) selon les recommandations du fournisseur. Soixante µg de protéines sont mélangés au solution d'échantillon et conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

2 - Préparation des fractions cytosoliques et membranaires des synaptosomes

Les surnageants post-nucléaires préparés à partir des cerveaux de rat sont centrifugés à 17 000g pendant 60 min. Le culot, contenant les synaptosomes, est repris dans un tampon hypotonique (10 mM d'HEPES-NaOH à pH 7,4) et incubé à 4°C pendant 30 min.

Les fractions cytosoliques et membranaires sont séparées par centrifugation à 27 000g pendant 40 min.

F / Séparation des organelles par sédimentation sur gradient continu de saccharose

1 - Constitution des gradients continus

Pour obtenir un gradient continu de saccharose allant de 0,3 mM à 1,6 mM, trois solutions à 0,8 mM, 1,2 mM et 1,6 mM (dans une solution d'EDTA à 80 mM et 200 mM de TRIS à pH=7) sont utilisées. La solution la plus concentrée est déposée au fond du tube et les autres sont déposées au dessus dans un ordre de concentration décroissante. Une alternance de quatre congélations à -20°C et décongélations à température ambiante, permet de mélanger les solutions au niveau des interphases et ainsi d'obtenir un gradient continu.

2 - Préparation des extraits de MIN6 en vue de la séparation sur gradient continu de saccharose

Les cellules MIN6 cultivées jusqu'à confluence, sont rincées deux fois au PBS à pH 7,4 sans Mg^{2+} ni Ca^{2+} puis décollées par une incubation de 10 min à 37°C dans une solution de PBS contenant 10 mM d'EDTA. Après une centrifugation à 800 g pendant 5 min, les cellules sont resuspendues dans un **solution de lyse pour gradient** puis cassées par passage dans une bombe à nitrogène. Ce système permet la dissolution lente d'azote gazeux dans la solution contenant les cellules (30 bars pendant 20 min). La rupture rapide de la pression dans la chambre entraîne le retour à l'état gazeux de l'azote dissout sous forme de petites bulles. Ces bulles vont casser les membranes plasmiques tout en préservant les organelles. Après deux passages successifs dans la bombe à nitrogène, les cellules non cassées ainsi que les noyaux sont éliminés de la solution par 10 min de centrifugation à 1000 g à 4°C.

Cette solution (3 ml) à 0,3 mM de saccharose est déposée sur le haut du gradient continu, la séparation des organelles se fait ensuite par répartition en fonction de la vitesse de sédimentation lors d'une centrifugation à l'équilibre pendant 18h à 110 000 g et à 4°C dans un rotor à godets horizontaux (Beckman JS-24).

3 - Caractérisation du gradient

Après la centrifugation, le gradient est caractérisé par la concentration des différentes fractions en protéines, en saccharose ainsi que la répartition des différents marqueurs des organelles. La concentration en protéines totales de chaque fraction est dosée par la méthode de Bradford selon les recommandations du fournisseur (BioRad). La concentration en saccharose est évaluée par mesure de la diffraction de la lumière. Pour chaque fraction, la densité de sucre est mesurée à l'aide d'un réfractomètre, grâce à une courbe standard, la concentration en saccharose peut être déduite de cette mesure. La concentration en insuline de chaque fraction est dosée par méthode ELISA selon les recommandations du fournisseur (Roche Diagnostics). La répartition au sein des fractions des marqueurs des organelles est révélée par immunodétection.

G/ Immunodétection (Western Blot)

1 - Séparation des protéines par électrophorèse en condition dénaturante

Les échantillons protéiques, dénaturés dans du solution d'échantillon pendant 1 min à 95°C, sont séparés en fonction de leur taille sur gel de polyacrylamide comprenant une **zone de concentration** à 4% de polyacrylamide puis une **zone de séparation** à 10%. La migration se fait à 15 mA constant dans la zone de concentration puis 30 mA constant dans la zone de séparation.

2 - Immunodétection

Après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF par action d'un courant constant à 15V pendant 1 heure à 4°C, dans un **tampon de transfert** (transfert semi-sec, système BioRad). La membrane est ensuite colorée au bleu de Coomassie (**coloration des membranes**) et les sites aspécifiques sont saturés par un tampon **TBS** contenant 0,1% de tween 20 (v:v) et 5% (m:v) de lait (TBS-T lait), pendant 1 heure à température ambiante. La membrane est rincée 3 fois pendant 5 min dans du TBS-T puis incubée 90 min, à température ambiante, dans la solution d'anticorps primaires dilués dans du TBS-T lait. Après 3 rinçages de 5 min au TBS-T la membrane est incubée 45 min, à température ambiante, dans la solution d'anticorps secondaires couplés à la peroxydase dilués dans le TBS-T lait. Le signal est révélé par chémiluminescence (solution ECL Lumi-Light^{plus}, Roche diagnostics) et les images sont obtenues via une caméra couplée à un programme d'analyse d'image Fluorchem (AlphaInnotec).

H/ Immunofluorescence

1 - Isolement des cellules primaires pour l'immunofluorescence

1.1 - Préparation des îlots de Langerhans de souris

Pour chaque préparation, quatre souris sont décapitées et le pancréas est isolé. Le tissu est découpé dans du milieu **HBSS** froid, rincé trois fois par décantation dans le même tampon, puis dissocié par action de la collagénase (0,5 mg par pancréas)

pendant 7 min à 37°C sous agitation vigoureuse. Les îlots sont ensuite isolés sous une loupe binoculaire en présence d'un colorant qui révèle le Zinc contenu dans les cellules contenant l'insuline. La dispersion cellulaire des îlots est achevée par action de la trypsine (20 mg/ml) 5 min à 37°C. L'action de la trypsine est arrêtée par l'ajout de 5 ml de milieu de culture froid.

Les cellules sont ensuite rincées deux fois dans 5 ml de milieu complet puis ensemencées sur lamelles de verre traitées à la poly-L-lysine¹ à raison d'environ 8 îlots par puits dans des plaques 4-puits. Pour permettre aux cellules d'adhérer fermement à la lamelle, la culture est maintenue pendant 3 jours.

Milieu de culture : DMEM (Gibco 41965)

10% Sérum de veau fœtal

50 U/ml de pénicilline

50 µg/ml de streptomycine

1.2 - Neurones d'hippocampe de rat embryonnaire au stade E18

Les rates gestantes sont sacrifiées par décapitation. Les embryons de 18 jours sont prélevés et sacrifiés à leur tour. Sous une loupe binoculaire, les crânes sont ouverts et les hippocampes isolés. Les cellules sont dissociées par action mécanique après une incubation de 15 minutes dans une solution de trypsine (0,5 g/L) à 37°C. Les cellules sont ensemencées à une densité de 100 000 cellules par boîte de pétri de 25 cm², sur des lamelles de verre traitées à la poly-L-lysine. Les neurones sont cultivés 10 jours en présence de 200 000 cellules gliales.

Milieu de culture : MEM (Gibco 51200)

26 mM de NaHCO₃

3,34 mM de glucose

2 mM de glutamine

2% d'acides aminés essentiels (Gibco 11130)

1% d'acides aminés non essentiels (Gibco 11140)

10% de sérum de cheval.

¹Traitement des lamelles à la poly-L-lysine : chaque lamelle est incubée 5 min avec 200 µl de poly-L-lysine à température ambiante puis rincée deux fois avec 500 µl de PBS pH=7,4.

1.3 - Préparation des cellules chromaffines de boeuf

Les glandes surrénales sont détachées et rincées deux fois au tampon KRB. Les glandes sont ensuite incubées avec 0.1 g/l de protéase (Sigma) pendant 15 min à 37°C. Les medulla sont détachées du cortex, coupées finement et incubées avec une solution de collagénase (200 mg/ml) pendant 30 à 40 min.

La suspension est ensuite centrifugée à 1000 rpm pendant 10 min. Le culot est rincé au KRB, deux fois, par centrifugation à 400 rpm pendant 10 min. La suspension est à nouveau centrifugée (400 rpm pendant 10min) en présence de KRB contenant 4% de BSA. Les cellules sont ensuite comptées etensemencées dans le milieu de culture jusqu'au jour de l'expérience.

Milieu de culture : DMEM (Gibco 42430)

50 U/ml de pénicilline

50 µg/ml de streptomycin

10 µM Cyt Arab/FUDR (Sigma)

10% Sérum de veau fœtal

2 - Ensemencement des cellules clonales pour l'immunofluorescence

Les cellules HIT-T15, MIN-6 ou PC12 sontensemencées dans une plaque 24-puits sur une lamelle de verre à une densité de 50 000 cellules par puits. Les cellules sont ainsi cultivées jusqu'à 70 à 80% de confluence à 37°C dans une atmosphère humide.

3 - Immunofluorescence

Le jour de l'expérimentation, les cellules sont rincées deux fois au PBS à pH=7,4, puis fixées 20 min à température ambiante dans une solution de PBS contenant 4% de paraformaldéhyde. Après deux rinçages au PBS les cellules sont perméabilisées par une incubation de 45 min à température ambiante dans une solution de PBS contenant 10% de sérum de cheval (PBS-10%SC) et 0,1% de saponine. Les anticorps primaires, dilués dans une solution de PBS-10%SC, sont ensuite déposés sur les lamelles pendant 1 heure et 30 min à température ambiante. Après trois rinçages au PBS, les cellules sont mises en contact avec les anticorps secondaires couplés à un fluorophore dilués dans du PBS-10%SC pendant 45 min à température ambiante. Enfin, les lamelles sont rincées

deux fois au PBS puis montées sur des lames de verre avec une solution de vectastain (Vector laboratories). Les lamelles sont ensuite scellées au vernis et conservées à 4°C à l'abri de la lumière.

L'observation des lames est réalisée grâce à un microscope laser confocal Zeiss couplé à un système d'analyse d'image LSM 510 META.

I/ Sécrétion stimulée d'hormone de croissance

1 - Transfection transitoire

Les cellules HIT-T15,ensemencées à une densité de 50 000 cellules par puits sur une plaque 24-puits, sont transfectées trois jours plus tard. Le mélange d'ADN comprend 60% d'ADN codant pour la protéine Flag-Syt 9 (pCMVtag2-Syt 9) sauvage ou mutée et 40% de plasmide (pcI-hGH ou pcNeo-PPI) codant pour l'hormone de croissance humaine (Wick et al., 1993) ou la pré-pro-insuline humaine. Le mélange contenant un total de 400 ng d'ADN et 1 µl d'agent transfectant lipofectamine²⁰⁰⁰ (Invitrogen) dans 100 µl d'Optimem (Invitrogen) est ajouté aux cellules en présence de 1 ml de milieu complet. Les cellules sont utilisées pour l'incubation statique 3 jours après la transfection.

2 - Incubation statique

Les cellules HIT-T15 transfectées sont utilisées pour une incubation statique permettant la mesure de la sécrétion de l'hormone de croissance stimulée par le KCl. Les cellules, constamment maintenues dans un bain à 37°C, sont rincées deux fois 12 min avec 500 µl par puits de **Kreb's Ringer Buffer** (KRB). Les cellules sont ensuite incubées 12 min avec 400 µl de KRB contenant, ou non 50 mM de KCl. Après stimulation, 350 µl de surnageant cellulaire, contenant le produit d'exocytose, sont prélevés et placés dans la glace. Une centrifugation de 3 min à 800 g et à 4°C permet d'éliminer les quelques cellules qui auraient pu être prélevées. Le surnageant est conservé jusqu'au dosage à -20°C, en présence de 0,036% de BSA pour éviter que l'hormone ne s'adsorbe sur les parois du tube. Afin de doser la quantité d'hormone de croissance intracellulaire les cellules incubées dans le KRB (non stimulées) sont décollées (300 µl de **PBS** contenant 10 mM d'EDTA à pH=7.4), incubées en présence de

1% triton X100 pendant 20 min à 4°C et conservées à -20°C jusqu'au dosage. La quantité d'hormone de croissance est mesurée pour chaque échantillon par dosage ELISA (Roche).

Le taux de surexpression de la protéine Flag-Syt 9 est vérifié par immunodétection sur les cellules qui ont subi la stimulation. Les cellules sont décollées (300 µl de **PBS** contenant 10 mM d'EDTA à pH=7.4) et centrifugées à 1000 g pendant 10 min à 4°C. Le culot est dilué dans 30 µl de PBS contenant 1% de Triton X-100 et incubées 20 min à 4°C, soniqué 10 sec et conservé à -20°C dans du **solution d'échantillon**.

ANNEXE 1 : COMPOSITION DES SOLUTIONS**Coloration des membranes**

Méthanol	25 %
Acide Acétique	10 %
Coomassie Brilliant blue R-250	0,05 %
Incuber 5 min puis décolorer avec Méthanol	50 %
Acide Acétique	7 %

Eau DEPC

0,2 % de DEPC, laisser le mélange se faire toute la nuit.

Autoclaver pour détruire le DEPC avant utilisation.

Gel de polyacrylamide

Zone de concentration du gel	
Tris pH 6,8	250 mM
SDS	0,2 % (v/v)
Acrylamide	4 % (v/v)
APS	0,2 % (v/v)
TEMED	0,4 % (v/v)

Zone de séparation du gel	
Tris pH 8,8	375 mM
SDS	0,1 % (v/v)
Acrylamide	10 % (v/v)
APS	0,1 % (v/v)
TEMED	0,1 % (v/v)

HBSS pH 7,4

NaCl	137 mM
Glucose	5,6 mM
KCl	5,4 mM
Na ₂ HPO ₄	0,5 mM
NaHCO ₃	4,2 mM
KH ₂ PO ₄	0,4 mM
MgCl ₂	0,5 mM
MgSO ₄	0,6 mM
CaCl ₂	1,3 mM

KRB pH 7,4

HEPES	25 mM
NaCl	125 mM
KCl	5 mM
MgSO ₄	2 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
CaCl ₂	1 mM
Glucose	3 mM
BSA	0,05%

LB liquide et solide

Tryptone	10 g/L
Yeast Extract	5 g/L
NaCl	5 g/L

Pour le milieu liquide ajouter

NaOH 1N	10 % (v/v)
---------	------------

Pour le milieu solide ajouter

Agar	20 g /L
Ampicilline	100 µg/ml
Kanamycine	30 µg/ml

PBS pH 7,4

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	4,3 mM
K ₂ HPO ₄	1,4 mM

TAE

Tris Acetate	40 mM
EDTA	2 mM

TBE

Tris	89 mM
Borate	89 mM
EDTA	2 mM

TBS (Tris buffer saline)

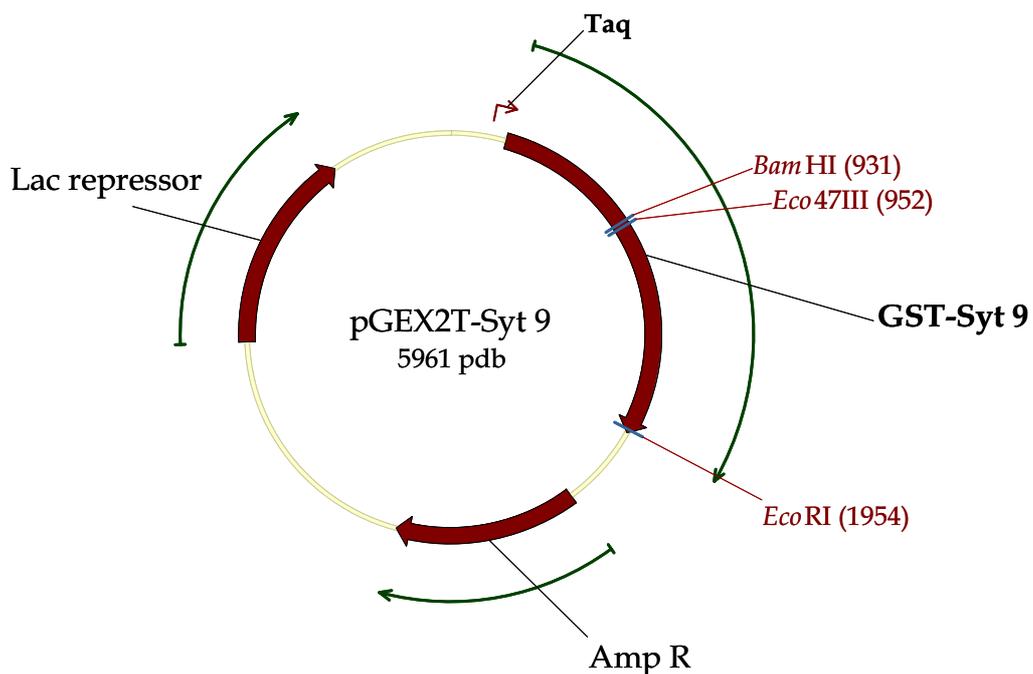
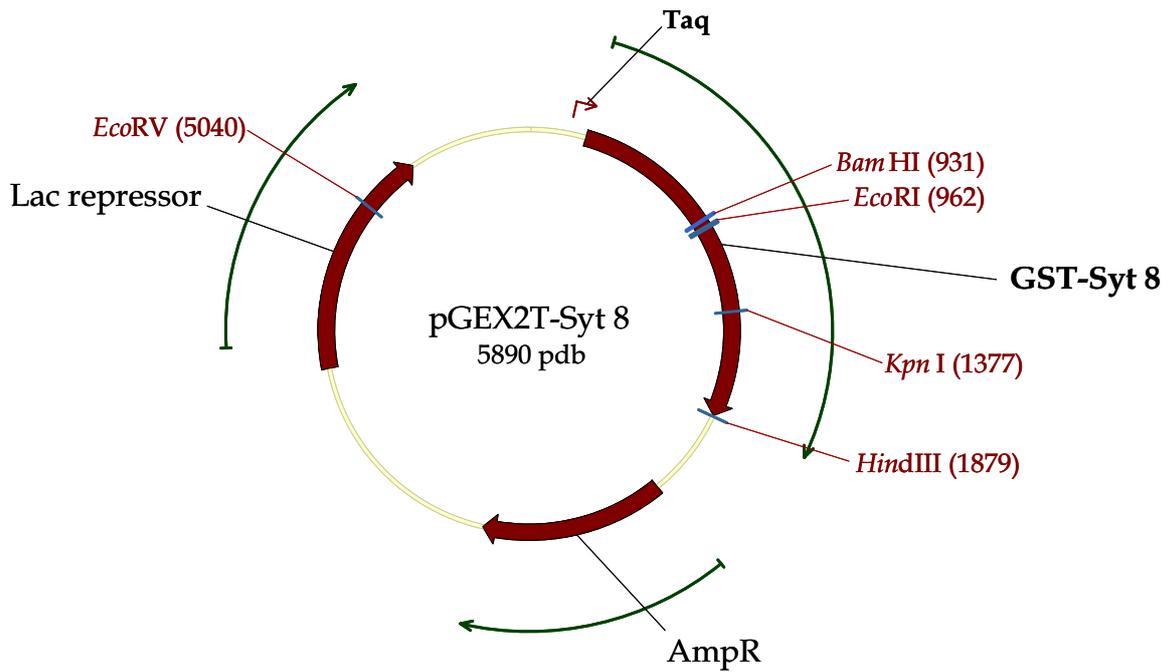
Tris	50 mM
NaCl	190 mM

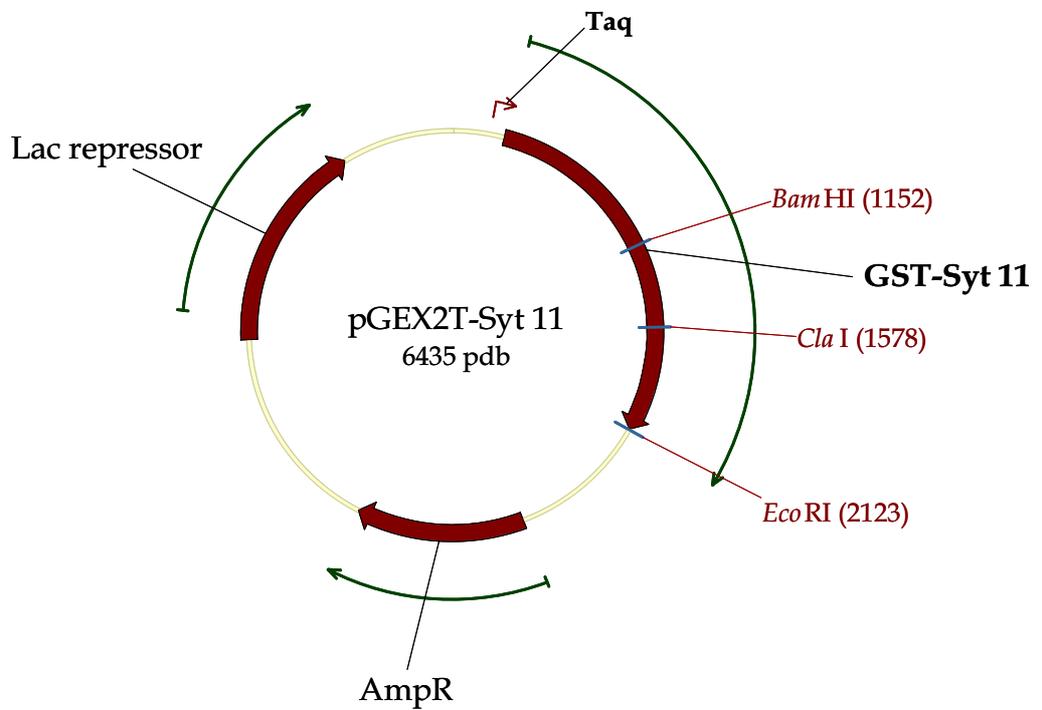
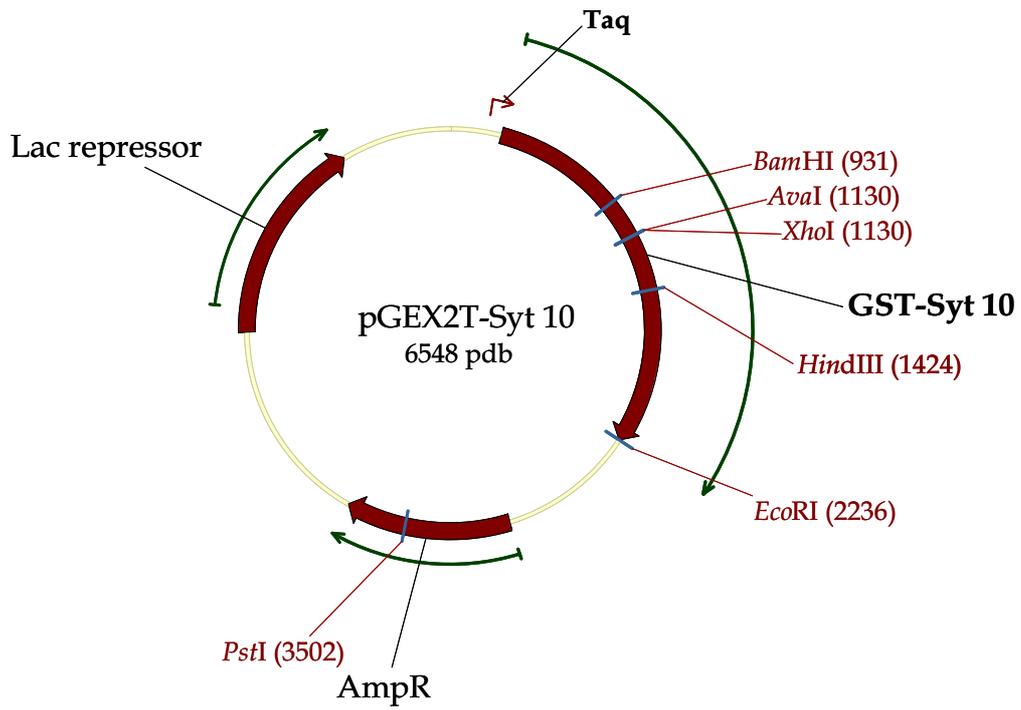
Solution d'échantillon (ADN)		Tampon de migration pour électrophorèse	
Glycerol	20 %	Tris	25 mM
bleu de bromophenol	1 mg/ml	Glycine	320 mM
		SDS	3,5 mM
Solution d'échantillon (protéines)		Tampon saccharose pH 7,4	
Glycérol	10 % (v/v)	Saccharose	0,32 mM
SDS	2 % (v/v)	PMSF	0,5 mM
bleu de bromophenol	50 mg/L	Aprotinine	1 µg/l
β-mercaptoethanol	8 % (v/v)	Pepstatine	1 µg/l
		Leupeptine	1 µg/l
Solution de lyse bactérienne		DTT	1 mM
EDTA	2 mM	EDTA	1 mM
PMSF	0,5 mM	Tris	5 mM
Pepstatine	1 µg/l	Tampon de Transfert	
Leupeptine	1 µg/l	Tris	47,8 mM
Aprotinine	1 µg/l	Glycine	38,6 mM
Lysozyme	200 µg/ml	SDS	1,28 mM
PBS à pH 8			
Solution de lyse cellulaire			
EGTA	2 mM		
Aprotinine	1 µg/l		
Pepstatine	1 µg/l		
Leupeptine	1 µg/l		
PMSF	0,5 mM		
DTT	1 mM		
Triton X100	0,1 % (v/v)		
PBS pH 7,4			
Solution de lyse pour gradient			
Saccharose	0,25 mM		
Na ₂ EDTA	4 mM		
PMSF	0,5 mM		
Pepstatine	1 µg/l		
Aprotinine	1 µg/l		
Leupeptine	1 µg/l		
DTT	1 mM		
Tris pH 7	10 mM		

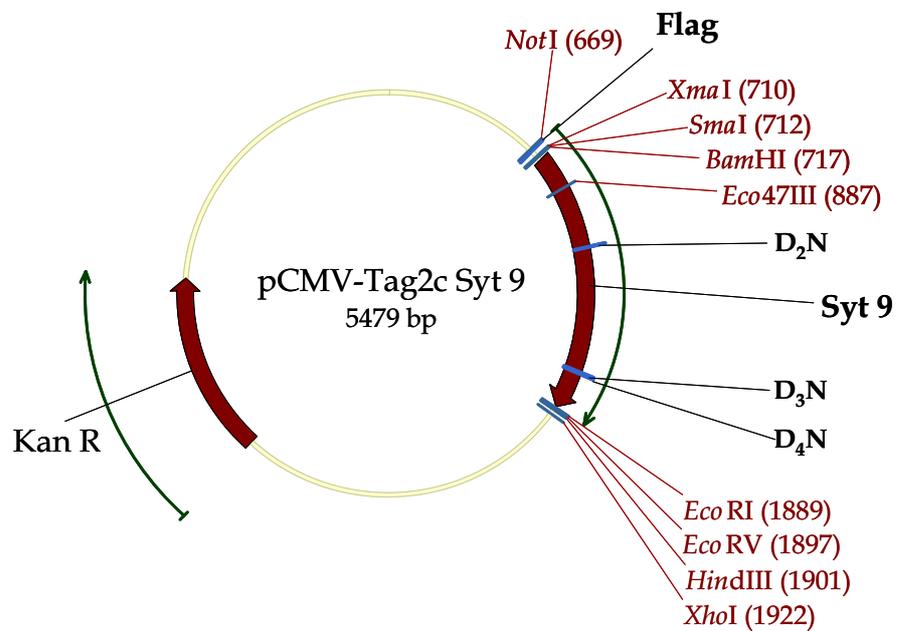
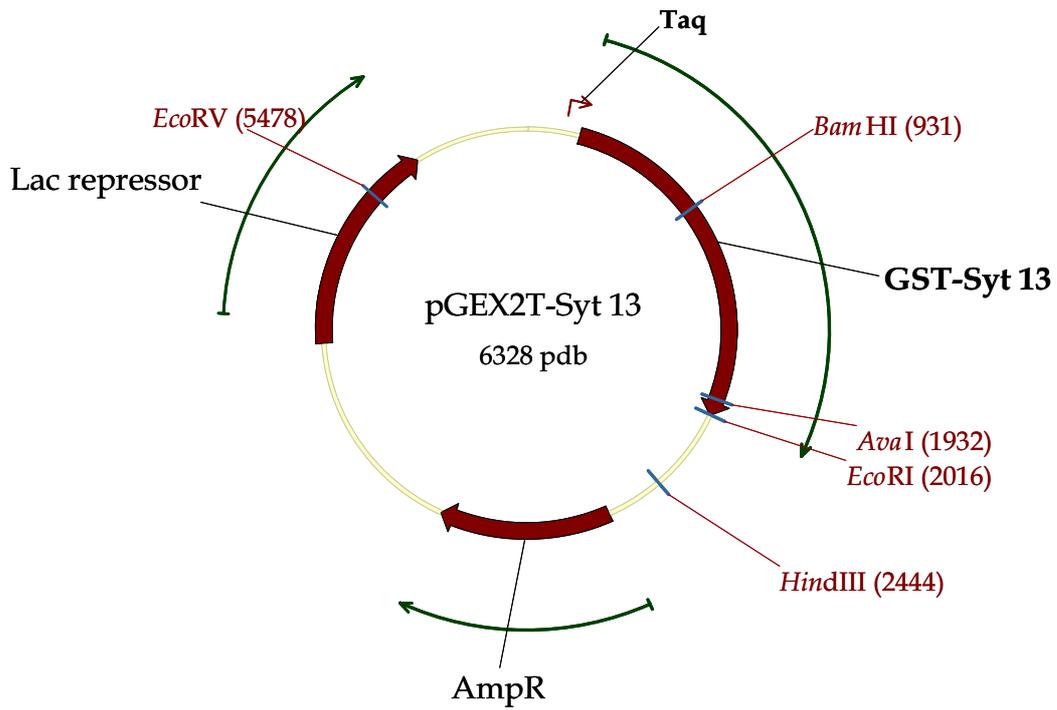
ANNEXE 2 : SCHÉMATISATION DE LA SÉQUENCE DES PLASMIDES CONSTRUITS

Pour toutes les figures, les sites de coupure des endonucléases ne sont indiqués que lorsqu'ils sont uniques.

Abréviations : *tac* ; promoteur procaryote, Amp R ; gène de résistance à l'ampicilline, Kan R ; gène de résistance à la Kanamycine, *pdb* ; paires de bases.







ANNEXE 3 : PROTOCOLE D'IMMUNISATION DES LAPINS POUR LA PRODUCTION DES ANTICORPS POLYCLONAUX : EXEMPLE POUR SYT 8.

CovalAb Faculté de Médecine Lyon Sud 165, Chemin du Grand Revoyet - BP 12 69921 OULLINS CEDEX - France Tél. 04.78.86.30.98 Fax 04.78.86.31.30		Jochen LANG PBCM - IECB Tél. 05.56.84.33.49 Fax 05.56.84.33.48		Etude SYT VIII L01-76
Espèce Lapin Souche New Zealand White Origine CL Nombre 2 Sexe Femelle Poids J0 2,5 Kg	Statut S.P.F Zone Bât 2 Salle E9 Durée 132 Jours Responsable Anne GOURLOT Gaëlle DELFOSSE	Prél. Pré-immuns sup. : Immunogènes : JL-14CR		

Date	Jours	Protocole
16.07.01	J-3	Transfert et mise en place en zone d'expérimentation
19.07.01	JO	Prélèvement Sérum Contrôle (5ml) et conservation à -20°C 1 ^{ère} Injection intradermique (1ml) 1 Tube pour 2 lapins ➤ 1ml Ag + 1ml Freund Complet
09.08.01	J21	2 ^{ème} injection intradermique (1ml) 1 Tube pour 2 lapins ➤ 1ml Ag + 1ml Freund Incomplet
30.08.01	J42	3 ^{ème} injection intradermique (Idem J21)
10.09.01	J53	Prélèvement Sérum Test (5 à 20 ml) et conservation à 4°C
12.09.01	J55	Expédition Sérums JO et J53
20.09.01	J63	1 ^{ère} injection sous cutanée (1 ml) 1 Tube pour 2 lapins ➤ 1ml Ag + 1ml Freund Incomplet
01.10.01	J74	Prélèvement Sérum Test (5 à 20 ml) et conservation à 4°C
03.10.01	J76	Expédition Sérums J74

25.10.01	J98	Prélèvement Sérum FINAL, Lapin n°142
02.11.01	J106	2 ^{ème} injection sous cutanée (Idem J21)
12.11.01	J116	Prélèvement Sérum Test (5 ml) et conservation à 4°C
14.11.01	J118	Expédition Sérums J116 et Anticorps immunopurifiés
28.11.01	J132	Prélèvement Sérum FINAL, Lapin n°143
05.12.01	J139	Expédition Sérums J132

N° Cage	N° Identification	Antigène
N°142	J 142 32	SYT VIII
N°143	J 142 26	SYT VIII

BIBLIOGRAPHIE

A

- Allbritton, N. L., Meyer, T., and Stryer, L. (1992). Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Science* 258, 1812-1815.
- Alter, C. A., and Wolf, B. A. (1995). Identification of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in pancreatic islets and insulin-secreting beta-cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208, 190-197.
- Andrews, N. W. (2000). Regulated secretion of conventional lysosomes. *Trends Cell. Biol.* 10, 316-321.
- Anello, M., Ucciardello, V., Piro, S., Patane, G., Frittitta, L., Calabrese, V., Giuffrida Stella, A. M., Vigneri, R., Purrello, F., and Rabuazzo, A. M. (2001). Chronic exposure to high leucine impairs glucose-induced insulin release by lowering the ATP-to-ADP ratio. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281, E1082-1087.
- Aravanis, A. M., Pyle, J. L., and Tsien, R. W. (2003). Single synaptic vesicles fusing transiently and successively without loss of identity. *Nature* 423, 643-647.
- 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, 18249-18252.
- Arkhammar, P., Nilsson, T., Rorsman, P., and Berggren, P. O. (1987). Inhibition of ATP-regulated K⁺ channels precedes depolarization-induced increase in cytoplasmic free Ca²⁺ concentration in pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.* 262, 5448-5454.
- Arribas, M., Regazzi, R., Garcia, E., Wollheim, C. B., and Decamilli, P. (1997). The stimulatory effect of rabphilin 3a on regulated exocytosis from insulin-secreting cells does not require an association-dissociation cycle with membranes mediated by rab 3. *Eur. J. Cell. Biol.* 74, 209-216.
- 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, 446-448.
- Ashcroft, F. M., and Rorsman, P. (1989). Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 54, 87-143.
- Aspinwall, C. A., Lakey, J. R., and Kennedy, R. T. (1999). Insulin-stimulated insulin secretion in single pancreatic beta cells. *J. Biol. Chem.* 274, 6360-6365.
- Augustine, G. J. (2001). How does calcium trigger neurotransmitter release? *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 320-326.

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. USA* 94, 2638-2641.
- 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, 25427-25435.

- Bai, J., Wang, P., and Chapman, E. R. (2002). C2A activates a cryptic Ca²⁺-triggered membrane penetration activity within the C2B domain of synaptotagmin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 1665-1670.
- Bai, J., Tucker, W. C., and Chapman, E. R. (2004a). PIP₂ 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, 929-942.
- Baram, D., Linial, M., Mekori, Y. A., and Sagi-Eisenberg, R. (1998). Ca²⁺-dependent exocytosis in mast cells is stimulated by the Ca²⁺ sensor, synaptotagmin I. *J. Immunol.* 161, 5120-5123.
- Barg, S., Huang, P., Eliasson, L., Nelson, D. J., Obermuller, S., Rorsman, P., Thevenod, F., and Renstrom, E. (2001). Priming of insulin granules for exocytosis by granular Cl⁻ uptake and acidification. *J. Cell. Sci.* 114, 2145-2154.
- Barg, S., Eliasson, L., Renstrom, E., and Rorsman, P. (2002). A subset of 50 secretory granules in close contact with L-type Ca²⁺ channels accounts for first-phase insulin secretion in mouse beta-cells. *Diabetes* 51 Suppl 1, S74-82.
- Barg, S. (2003). Mechanisms of exocytosis in insulin-secreting B-cells and glucagon-secreting A-cells. *Pharmacol. Toxicol.* 92, 3-13.
- Bataille, D. (2002). [Molecular mechanisms of insulin secretion]. *Diabetes Metab.* 28, 4S7-13.
- 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, 1206-1216.
- 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, 1294-1302.
- Biden, T. J., Peter Riesch, B., Schlegel, W., and Wollheim, C. B. (1987). Ca²⁺-mediated generation of inositol 1,4,5-triphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate in pancreatic islets. Studies with K⁺, glucose, and carbamylcholine. *J. Biol. Chem.* 262, 3567-3571.
- 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. USA* 85, 7852-7856.
- Boal, F., Zhang, H., Tessier, C., Scotti, P. A., and Lang, J. (in press). The variable C-terminus of cysteine string proteins modulates exocytosis and protein-protein interactions. *Biochemistry*.
- Bock, J. B., Matern, H. T., Peden, A. A., and Scheller, R. H. (2001). A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* 409, 839-841.

- Bokvist, K., Eliasson, L., Ammala, C., Renstrom, E., and Rorsman, P. (1995). Co-localization of L-type Ca²⁺ channels and insulin-containing secretory granules and its significance for the initiation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *EMBO. J.* 14, 50-57.
- Bollmann, J. H., Sakmann, B., and Borst, J. G. (2000). Calcium sensitivity of glutamate release in a calyx-type terminal. *Science* 289, 953-957.
- 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, 163-165.
- Boyd, R. S., Duggan, M. J., Shone, C. S., and Foster, K. A. (1995). The effect of botulinum neurotoxins on the release of insulin from the insulinoma cell lines HIT-T15 and RINm5F. *J. Biol. Chem.* 270, 18216-18218.
- 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.
- Brown, H., Meister, B., Deeney, J., Corkey, B. E., Yang, S. N., Larsson, O., Rhodes, C. J., Seino, S., Berggren, P. O., and Fried, G. (2000). Synaptotagmin III isoform is compartmentalized in pancreatic beta-cells and has a functional role in exocytosis. *Diabetes* 49, 383-391.
- Burgoyne, R. D., and Morgan, A. (1995). Ca²⁺ and secretory-vesicle dynamics. *Trends Neurosci.* 18, 191-196.
- Burgoyne, R. D., and Clague, M. J. (2003a). Calcium and calmodulin in membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta* 1641, 137-143.
- Burgoyne, R. D., and Morgan, A. (2003b). 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, 18290-18296.

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, 1097-1104.
- 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.
- 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, 543-549.

- Chanturiya, A., Chernomordik, L. V., and Zimmerberg, J. (1997). Flickering fusion pores comparable with initial exocytotic pores occur in protein-free phospholipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *94*, 14423-14428.
- 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*, 5735-5741.
- Chapman, E. R., Hanson, P. I., An, S., and Jahn, R. (1995). Ca²⁺ regulates the interaction between synaptotagmin and syntaxin 1. *J. Biol. Chem.* *270*, 23667-23671.
- 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*, 326-332.
- Chapman, E. R., and Davis, A. F. (1998). Direct interaction of a Ca²⁺-binding loop of synaptotagmin with lipid bilayers. *J. Biol. Chem.* *273*, 13995-14001.
- Chapman, E. R. (2002). Synaptotagmin: a Ca(2+) sensor that triggers exocytosis? *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* *3*, 498-508.
- 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*, 4591-4596.
- Chen, Y. A., Scales, S. J., and Scheller, R. H. (2001). Sequential SNARE assembly underlies priming and triggering of exocytosis. *Neuron* *30*, 161-170.
- Chen, P. C., Kernytsky, A., and Rost, B. (2002). Transmembrane helix predictions revisited. *Protein Sci.* *11*, 2774-2779.
- 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*, 709-721.
- Cohen, R., Elferink, L. A., and Atlas, D. (2003). The C2A domain of synaptotagmin alters the kinetics of voltage-gated Ca²⁺ channels Ca(v)1.2 (Lc-type) and Ca(v)2.3 (R-type). *J. Biol. Chem.* *278*, 9258-9266.
- Colombo, M. I., Beron, W., and Stahl, P. D. (1997). Calmodulin regulates endosome fusion. *J. Biol. Chem.* *272*, 7707-7712.
- Coppola, T., Magnin-Luthi, S., Perret-Menoud, V., Gattesco, S., Schiavo, G., and Regazzi, R. (2001). Direct interaction of the Rab3 effector RIM with Ca²⁺ channels, SNAP-25 and synaptotagmin. *J. Biol. Chem.* *276*, 32756-32762.
- Craxton, M., and Goedert, M. (1999). Alternative splicing of synaptotagmins involving transmembrane exon skipping. *FEBS Lett.* *460*, 417-422.
- Craxton, M. (2001). Genomic analysis of synaptotagmin genes. *Genomics* *77*, 43-49.
- Craxton, M. (2004). Synaptotagmin gene content of the sequenced genomes. *BMC Genomics* *5*, 43.

D

- Dai, H., Shin, O. H., Machius, M., Tomchick, D. R., Sudhof, T. C., and Rizo, J. (2004). Structural basis for the evolutionary inactivation of Ca²⁺ binding to synaptotagmin 4. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 844-849.
- Dalle, S., Smith P., Blache P., Le-Nguyen, D., Le Brigand, L., Bergeron, F., Ashcroft, F. M., and Bataille, D. (1999). Miniglucagon (Glucagon 19-29), a potent and efficient inhibitor of secetagogue-induced insulin release through a Ca²⁺ pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 10869-10876.
- Dalle, S., Longuet, C., Costes, S., Broca, C., Faruque, O., Fontés, G., Hani, EH., and Bataille, D. (2004). Glucagon promotes cAMP-response element binding protein phosphorylation via activation of ERK1/2 in MIN6 cell line and isolated Islets of Langerhans. *J. Biol. Chem.* 279, 20345-20355.
- Davis, A. F., Bai, J., Fasshauer, D., Wolowick, M. J., Lewis, J. L., and Chapman, E. R. (1999). Kinetics of synaptotagmin responses to Ca²⁺ and assembly with the core SNARE complex onto membranes. *Neuron* 24, 363-376.
- 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, 6816-6822.
- Davletov, B. A., and Sudhof, T. C. (1993). A single C2 domain from synaptotagmin I is sufficient for high affinity Ca²⁺/phospholipid binding. *J. Biol. Chem.* 268, 26386-26390.
- Davletov, B. A., and Sudhof, T. C. (1994). Ca(2+)-dependent conformational change in synaptotagmin I. *J. Biol. Chem.* 269, 28547-28550.
- 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, 459-464.
- De Haro, L., Ferracci, G., Opi S., Iborra C., Quetlas S., Miquelis R., Lévêque C., and Seagar, M. (2004). Ca²⁺/Calmodulin transfers the membrane-proximal lipid-binding domain of the v-SNARE synaptobrevin from cis to trans bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 1578-1583.
- 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, 9363-9368.
- Deeney, J. T., Prentki, M., and Corkey, B. E. (2000b). Metabolic control of beta-cell function. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 11, 267-275.
- Detimary, P., Jonas, J. C., and Henquin, J. C. (1996). Stable and diffusible pools of nucleotides in pancreatic islet cells. *Endocrinology* 137, 4671-4676.
- DiAntonio, A., Burgess, R. W., Chin, A. C., Deitcher, D. L., Scheller, R. H., and Schwarz, T. L. (1993a). Identification and characterization of *Drosophila* genes for synaptic vesicle proteins. *J. Neurosci.* 13, 4924-4935.

- DiAntonio, A., Parfitt, K. D., and Schwarz, T. L. (1993b). Synaptic transmission persists in synaptotagmin mutants of *Drosophila*. *Cell* 73, 1281-1290.
- DiAntonio, A., and Schwarz, T. L. (1994). The effect on synaptic physiology of synaptotagmin mutations in *Drosophila*. *Neuron* 12, 909-920.
- Donelan, M. J., Morfini, G., Julyan, R., Sommers, S., Hays, L., Kajio, H., Briaud, I., Easom, R. A., Molkentin, J. D., Brady, S. T., and Rhodes, C. J. (2002). Ca²⁺-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, 24232-24242.

E

- Earles, C. A., Bai, J., Wang, P., and Chapman, E. R. (2001). The tandem C2 domains of synaptotagmin contain redundant Ca²⁺ binding sites that cooperate to engage t-SNAREs and trigger exocytosis. *J. Cell. Biol.* 154, 1117-1124.
- 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.
- Elferink, L. A., Peterson, M. R., and Scheller, R. H. (1993). A role for synaptotagmin (p65) in regulated exocytosis. *Cell* 72, 153-159.
- Eliasson, L., Proks, P., Ammala, C., Ashcroft, F. M., Bokvist, K., Renstrom, E., Rorsman, P., and Smith, P. A. (1996). Endocytosis of secretory granules in mouse pancreatic beta-cells evoked by transient elevation of cytosolic calcium. *J. Physiol.* 493 (Pt 3), 755-767.
- Eliasson, L., Renstrom, E., Ding, W. G., Proks, P., and Rorsman, P. (1997). Rapid ATP-dependent priming of secretory granules precedes Ca(2+)-induced exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *J. Physiol.* 503 (Pt 2), 399-412.
- Ernst, J. A., and Brunger, A. T. (2003). High resolution structure, stability, and synaptotagmin binding of a truncated neuronal SNARE complex. *J. Biol. Chem.* 278, 8630-8636.
- 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, 371-383.

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, 1057-1069.
- 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 Ca²⁺ binding to the C2A domain of synaptotagmin 1. *J. Neurosci.* 22, 8438-8446.

- Fiebig, K. M., Rice, L. M., Pollock, E., and Brunger, A. T. (1999). Folding intermediates of SNARE complex assembly. *Nat. Struct. Biol.* 6, 117-123.
- Fisher, R. J., Pevsner, J., and Burgoyne, R. D. (2001). Control of fusion pore dynamics during exocytosis by Munc18. *Science* 291, 875-878.
- Fisher, T. E., and Bourque, C. W. (2001). The function of Ca(2+) 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., Kojima, T., and Mikoshiba, K. (1996). Phospholipid composition dependence of Ca²⁺-dependent phospholipid binding to the C2A domain of synaptotagmin IV. *J. Biol. Chem.* 271, 8430-8434.
- Fukuda, M., and Mikoshiba, K. (1999a). A novel alternatively spliced variant of synaptotagmin VI lacking a transmembrane domain. Implications for distinct functions of the two isoforms. *J. Biol. Chem.* 274, 31428-31434.
- Fukuda, M., Kanno, E., and Mikoshiba, K. (1999b). Conserved N-terminal cysteine motif is essential for homo- and heterodimer formation of synaptotagmins III, V, VI, and X. *J. Biol. Chem.* 274, 31421-31427.
- 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, 28180-28185.
- Fukuda, M., and Mikoshiba, K. (2000b). Doc2gamma, a third isoform of double C2 protein, lacking calcium-dependent phospholipid binding activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 626-632.
- Fukuda, M., and Mikoshiba, K. (2000c). Genomic structures of synaptotagmin II protein: comparison of exon-intron organization of the synaptotagmin gene family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270, 528-532.
- Fukuda, M., Moreira, J. E., Liu, V., Sugimori, M., Mikoshiba, K., and Llinas, R. R. (2000d). Role of the conserved WHXL motif in the C terminus of synaptotagmin in synaptic vesicle docking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 14715-14719.
- Fukuda, M., and Mikoshiba, K. (2001a). Characterization of KIAA1427 protein as an atypical synaptotagmin (Syt XIII). *Biochem. J.* 354, 249-257.
- 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, 27670-27676.
- Fukuda, M., and Mikoshiba, K. (2001c). Synaptotagmin-like protein 1-3: a novel family of C-terminal-type tandem C2 proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 1226-1233.
- Fukuda, M., and Mikoshiba, K. (2001d). Tac2-N, an atypical C-type tandem C2 protein localized in the nucleus. *FEBS Lett.* 503, 217-218.

- Fukuda, M., Kanno, E., Ogata, Y., and Mikoshiba, K. (2001e). 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, 40319-40325.
- Fukuda, M., Saegusa, C., and Mikoshiba, K. (2001f). Novel splicing isoforms of synaptotagmin-like proteins 2 and 3: identification of the Slp homology domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283, 513-519.
- Fukuda, M., Kowalchuk, J. A., Zhang, X., Martin, T. F., and Mikoshiba, K. (2002a). Synaptotagmin IX regulates Ca²⁺-dependent secretion in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 277, 4601-4604.
- Fukuda, M. (2002b). Vesicle-associated membrane protein-2/synaptobrevin binding to synaptotagmin I promotes O-glycosylation of synaptotagmin I. *J. Biol. Chem.* 277, 30351-30358.
- Fukuda, M., Ogata, Y., Saegusa, C., Kanno, E., and Mikoshiba, K. (2002c). Alternative splicing isoforms of synaptotagmin VII in the mouse, rat and human. *Biochem. J.* 365, 173-180.
- Fukuda, M. (2003a). Distinct Rab Binding Specificity of Rim1, Rim2, Rabphilin, and Noc2. identification of a critical determinant of Rab3A/Rab27A recognition by Rim2. *J. Biol. Chem.* 278, 15373-15380.
- Fukuda, M. (2003b). Molecular cloning and characterization of human, rat, and mouse synaptotagmin XV. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306, 64-71.
- Fukuda, M. (2003c). Molecular cloning, expression, and characterization of a novel class of synaptotagmin (Syt XIV) conserved from Drosophila to humans. *J. Biochem.* 133, 641-649.
- Fukuda, M., Kanno, E., Ogata, Y., Saegusa, C., Kim, T., Loh, Y. P., and Yamamoto, A. (2003d). 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, 3220-3226.
- 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, 875-879.

G

- Gandhi, S. P., and Stevens, C. F. (2003). Three modes of synaptic vesicular recycling revealed by single-vesicle imaging. *Nature* 423, 607-613.
- Gao, Z., Reavey-Cantwell, J., Young, R. A., Jegier, P., and Wolf, B. A. (2000). Synaptotagmin III/VII isoforms mediate Ca²⁺-induced insulin secretion in pancreatic islet beta -cells. *J. Biol. Chem.* 275, 36079-36085.
- 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. USA* 97, 5883-5888.

- Geppert, M., Archer, B. T., 3rd, and Sudhof, T. C. (1991). Synaptotagmin II. A novel differentially distributed form of synaptotagmin. *J. Biol. Chem.* 266, 13548-13552.
- Geppert, M., Bolshakov, V. Y., Siegelbaum, S. A., Takei, K., De Camilli, P., Hammer, R. E., and Sudhof, T. C. (1994a). The role of Rab3A in neurotransmitter release. *Nature* 369, 493-497.
- Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R. E., Li, C., Rosahl, T. W., Stevens, C. F., and Sudhof, T. C. (1994b). Synaptotagmin I: a major Ca^{2+} sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* 79, 717-727.
- Gerber, S. H., Rizo, J., and Sudhof, T. C. (2001). The Top Loops of the C2 Domains from Synaptotagmin and Phospholipase A2 Control Functional Specificity. *J. Biol. Chem.* 276, 32288-32292.
- Gerber, S. H., and Sudhof, T. C. (2002). Molecular determinants of regulated exocytosis. *Diabetes* 51 Suppl 1, S3-11.
- Gerich, J. E. (1998). The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: Impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocr. Rev.* 19, 491-503.
- Gerona, R. R., Larsen, E. C., Kowalchuk, 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, 6328-6336.
- 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.
- Gilon, P., Ravier, M. A., Jonas, J. C., and Henquin, J. C. (2002). Control mechanisms of the oscillations of insulin secretion in vitro and in vivo. *Diabetes* 51 Suppl 1, S144-151.
- Graham, M. E., Sudlow, A. W., and Burgoyne, R. D. (1997). Evidence against an acute inhibitory role of nSec-1 (munc-18) in late steps of regulated exocytosis in chromaffin and PC12 cells. *J. Neurochem.* 69, 2369-2377.
- 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, 1281-1289.
- 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, 4397-4405.
- Gray, E. G. (1959). Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J. Anat.* 93, 420-433.
- 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, 145-154.
- Gromada, J., Bokvist, K., Ding, W. G., Barg, S., Buschard, K., Renstrom, E., and Rorsman, P. (1997). Adrenaline stimulates glucagon secretion in pancreatic A-cells by increasing the Ca^{2+} current and the number of granules close to the L-type Ca^{2+} channels. *J. Gen. Physiol.* 110, 217-228.

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, 583-594.

Gut, A., Kiraly, C. E., Fukuda, M., Mikoshiba, K., Wollheim, C. B., and Lang, J. (2001). Expression and localisation of synaptotagmin isoforms in endocrine β -cells: their function in insulin exocytosis. *J. Cell. Sci.* 114, 1709-1716.

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, 4307-4318.

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^{2+} -triggered exocytosis. *Science* 304, 289-292.

Heidelberger, R., Heinemann, C., Neher, E., and Matthews, G. (1994). Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. *Nature* 371, 513-515.

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.

Heinemann, C., von Ruden, L., Chow, R. H., and Neher, E. (1993). A two-step model of secretion control in neuroendocrine cells. *Pflugers Arch.* 424, 105-112.

Hilbush, B. S., and Morgan, J. I. (1994). A third synaptotagmin gene, *Syt3*, in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8195-8199.

Hilfiker, S., Pieribone, V. A., Czernik, A. J., Kao, H. T., Augustine, G. J., and Greengard, P. (1999). Synapsins as regulators of neurotransmitter release. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 354, 269-279.

Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Burnett, M. A., Matthews, D. R., and Turner, R. C. (1989). Similar reduction of first- and second-phase B-cell responses at three different glucose levels in type II diabetes and the effect of gliclazide therapy. *Metabolism* 38, 767-772.

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, 20417-20423.

Hudson, A. W., and Birnbaum, M. J. (1995). Identification of a nonneuronal isoform of synaptotagmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5895-5899.

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, 50-56.

Hutton, J. C. (1989). The insulin secretory granule. *Diabetologia* 32, 271-281.

Hutton, J. C. (1994). Insulin secretory granule biogenesis and the proinsulin-processing endopeptidases. *Diabetologia* 37 Suppl 2, S48-56.

Huynh, D. P., Scoles, D. R., Nguyen, D., and Pulst, S. M. (2003). The autosomal recessive juvenile Parkinson disease gene product, parkin, interacts with and ubiquitinates synaptotagmin XI. *Hum. Mol. Genet.* 12, 2587-2597.

I

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, 12267-12273.

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, 518-526.

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. *Molecular Endocrinology* 13, 202-212.

Iezzi, M., Kouri, G., Fukuda, M., and Wollheim, C. B. (2004). Synaptotagmin V and IX isoforms control Ca²⁺-dependent insulin exocytosis. *J. Cell. Sci.* 117, 3119-3127.

Inagaki, N., Gonoi, T., Clement, J. P. t., Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S., and Bryan, J. (1995). Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 270, 1166-1170.

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. USA* 91, 12487-12491.

Jahn, R., Lang, T., and Sudhof, T. C. (2003). Membrane fusion. *Cell* 112, 519-533.

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.

Jonkers, F. C., Jonas, J. C., Gilon, P., and Henquin, J. C. (1999). Influence of cell number on the characteristics and synchrony of Ca²⁺ oscillations in clusters of mouse pancreatic islet cells. *J. Physiol.* 520 (Pt 3), 839-849.

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, 196-199.

K

- Kee, Y., and Scheller, R. H. (1996). Localization of synaptotagmin-binding domains on syntaxin. *J. Neurosci.* 16, 1975-1981.
- Kieffer, T., Heller, R. S., Unson, C. G., Weir, G. C. and Habener, J. F. (1996). Distribution of glucagon receptors on hormone-specific endocrine cells of rat pancreatic islets. *Endocrinology* 137, 5119-5124.
- 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, F131-142.
- Koh, T. W., and Bellen, H. J. (2003). Synaptotagmin I, a Ca²⁺ sensor for neurotransmitter release. *Trends Neurosci.* 26, 413-422.

L

- 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, 3635-3644.
- 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, 5837-5846.
- Lang, J., Zhang, H., Fukuda, M., Mikoshiba, K., Niemann, H., and Wollheim, C. B. (1997b). Exocytosis of insulin from pancreatic β cells: Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent stimulation. *J. Gen. Physiol.* 110, 14a.
- Lang, J., Zhang, H., Vaidyanathan, V. V., Sadoul, K., Niemann, H., and Wollheim, C. B. (1997c). Transient expression of botulinum neurotoxin C1 light chain differentially inhibits calcium and glucose induced insulin secretion in clonal beta-cells. *FEBS Lett.* 419, 13-17.
- Lang, J. (1999). Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur. J. Biochem.* 259, 3-17.
- 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, 6306-6312.
- Li, C., Ullrich, B., Zhang, J. Z., Anderson, R. G., Brose, N., and Südhof, T. C. (1995). Ca²⁺-dependent and -independent activities of neural and non-neural synaptotagmins. *Nature* 375, 594-599.
- Li, G., Rungger Brandle, E., Just, I., Jonas, J. C., Aktories, K., and Wollheim, C. B. (1994a). 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, 1199-1213.
- Lindau, M., and Almers, W. (1995). Structure and function of fusion pores in exocytosis and ectoplasmic membrane fusion. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 7, 509-517.

- 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, 159-166.
- Link, E., Edelman, L., Chou, J. H., Binz, T., Yamasaki, S., Eisel, U., Baumert, M., Sudhof, T. C., Niemann, H., and Jahn, R. (1992). Tetanus toxin action: inhibition of neurotransmitter release linked to synaptobrevin proteolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189, 1017-1023.
- 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, 1125-1134.
- 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 Ca²⁺-triggered fusion and recycling of synaptic vesicles in vivo. *J. Neurosci.* 21, 1421-1433.

M

- Ma, L., Bindokas, V. P., Kuznetsov, A., Rhodes, C., Hays, L., Edwardson, J. M., Ueda, K., Steiner, D. F., and Philipson, L. H. (2004). Direct imaging shows that insulin granule exocytosis occurs by complete vesicle fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 9266-9271.
- MacDonald, M. J., and Fahien, L. A. (2000). Glutamate is not a messenger in insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 275, 34025-34027.
- Maechler, P., and Wollheim, C. B. (1999). Mitochondrial glutamate acts as a messenger in glucose-induced insulin exocytosis. *Nature* 402, 685-689.
- 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, 273-282.
- 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, 4906-4917.
- Marqueze, B., Berton, F., and Seagar, M. (2000). Synaptotagmins in membrane traffic: which vesicles do the tagmins tag? *Biochimie* 82, 409-420.
- Marshak, S., Leibowitz, G., Bertuzzi, F., Socci, C., Kaiser, N., Gross, D. J., Cerasi, E., and Melloul, D. (1999). Impaired beta-cell functions induced by chronic exposure of cultured human pancreatic islets to high glucose. *Diabetes* 48, 1230-1236.
- Martinez, I., Chakrabarti, S., Hellevik, T., Morehead, J., Fowler, K., and Andrews, N. W. (2000). Synaptotagmin VII regulates Ca(2+)-dependent exocytosis of lysosomes in fibroblasts. *J. Cell. Biol.* 148, 1141-1149.
- Martinez-Arca, S., Coco, S., Mainguy, G., Schenk, U., Alberts, P., Bouille, P., Mezzina, M., Prochiantz, A., Matteoli, M., Louvard, D., and Galli, T. (2001). A common exocytotic mechanism mediates axonal and dendritic outgrowth. *J. Neurosci.* 21, 3830-3838.

- 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, 257-269.
- Maycox, P. R., Link, E., Reetz, A., Morris, S. A., and Jahn, R. (1992). Clathrin-coated vesicles in nervous tissue are involved primarily in synaptic vesicle recycling. *J. Cell. Biol.* 118, 1379-1388.
- Melloul, D., Marshak, S., and Cerasi, E. (2002). Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia* 45, 309-326.
- Mendez, C. F., Leibiger, I. B., Leibiger, B., Hoy, M., Gromada, J., Berggren, P. O., and Bertorello, A. M. (2003). Rapid association of protein kinase C-epsilon with insulin granules is essential for insulin exocytosis. *J. Biol. Chem.* 278, 44753-44757.
- 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, 355-368.
- Mikoshiba, K., Fukuda, M., Moreira, J. E., Lewis, F. M., Sugimori, M., Niinobe, M., and Llinas, R. (1995). Role of the C2A domain of synaptotagmin in transmitter release as determined by specific antibody injection into the squid giant synapse preterminal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10703-10707.
- Misura, K. M., Scheller, R. H., and Weis, W. I. (2000). Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex. *Nature* 404, 355-362.
- Miyazaki, J., Araki, K., Yamato, E., Ikegami, H., Asano, T., Shibasaki, Y., Oka, Y., and Yamamura, K. (1990). Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology* 127, 126-132.
- Mizutani, A., Fukuda, M., Niinobe, M., and Mikoshiba, K. (1997). Regulation of AP-2-synaptotagmin interaction by inositol high polyphosphates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240, 128-131.
- Mohlig, M., Wolter, S., Mayer, P., Lang, J., Osterhoff, M., Horn, P. A., Schatz, H., and Pfeiffer, A. (1997). Insulinoma cells contain an isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II delta associated with insulin secretion vesicles. *Endocrinology* 138, 2577-2584.
- MPex www.biomol.uci.edu/mpex/MPEXdoc.html.
- 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, 1207-1221.
- Murray, D., and Honig, B. (2002). Electrostatic control of the membrane targeting of C2 domains. *Mol. Cell.* 9, 145-154.

N

- Nakamura, N., Yamamoto, A., Wada, Y., and Futai, M. (2000). Syntaxin 7 mediates endocytic trafficking to late endosomes. *J. Biol. Chem.* 275, 6523-6529.
- Nakano, K., Suga, S., Takeo, T., Ogawa, Y., Suda, T., Kanno, T., and Wakui, M. (2002). Intracellular Ca²⁺ modulation of ATP-sensitive K⁺ channel activity in acetylcholine-induced activation of rat pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 143, 569-576.
- 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 Ca²⁺ signaling pathways display functional and mechanistic diversity. *Biochemistry* 40, 3089-3100.
- Neher, E. (1993). Cell physiology. Secretion without full fusion. *Nature* 363, 497-498.
- Neher, E., and Penner, R. (1994). Mice sans synaptotagmin. *Nature* 372, 316-317.
- Nesher, R., and Cerasi, E. (2002). Modeling phasic insulin release: immediate and time-dependent effects of glucose. *Diabetes* 51 Suppl 1, S53-59.
- Nicholson, K. L., Munson, M., Miller, R. B., Filip, T. J., Fairman, R., and Hughson, F. M. (1998). Regulation of SNARE complex assembly by an N-terminal domain of the t-SNARE Sso1p. *Nat. Struct. Biol.* 5, 793-802.
- Nicholson-Tomishima, K., and Ryan, T. A. (2004). Kinetic efficiency of endocytosis at mammalian CNS synapses requires synaptotagmin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.
- 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, 1291-1305.
- 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, 205-215.
- 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. USA* 76, 1858-1862.

O

- 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.
- Osborne, S. L., Herreros, J., Bastiaens, P. I. H., 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.
- Ossig, R., Schmitt, H. D., de Groot, B., Riedel, D., Keranen, S., Ronne, H., Grubmuller, H., and Jahn, R. (2000). Exocytosis requires asymmetry in the central layer of the SNARE complex. *EMBO J.* 19, 6000-6010.

P

- Pereira-Leal, J. B., and Seabra, M. C. (2000). The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily. *J. Mol. Biol.* 301, 1077-1087.
- Perin, M. S., Brose, N., Jahn, R., and Sudhof, T. C. (1991). Domain structure of synaptotagmin (p65). *J. Biol. Chem.* 266, 623-629.
- Perin, M. S. (1994). The COOH terminus of synaptotagmin mediates interaction with the neuexins. *J. Biol. Chem.* 269, 8576-8581.
- Perin, M. S. (1996). Mirror image motifs mediate the interaction of the COOH terminus of multiple synaptotagmins with the neuexins and calmodulin. *Biochemistry* 35, 13808-13816.
- Peters, C., and Mayer, A. (1998). Ca²⁺/calmodulin signals the completion of docking and triggers a late step of vacuole fusion. *Nature* 396, 575-580.
- Peters, C., Bayer, M. J., Buhler, S., Andersen, J. S., Mann, M., and Mayer, A. (2001). Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature* 409, 581-588.
- Petrenko, A. G. (1993). alpha-Latrotoxin receptor. Implications in nerve terminal function. *FEBS Lett.* 325, 81-85.
- Platano, D., Pollo, A., Carbone, E., and Aicardi, G. (1996). Up-regulation of L- and non-L, non-N-type Ca²⁺ channels by basal and stimulated protein kinase C activation in insulin-secreting RINm5F cells. *FEBS Lett.* 391, 189-194.

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, 20471-20479.
- Ravier, M. A., Sehlin, J., and Henquin, J. C. (2002). Disorganization of cytoplasmic Ca⁽²⁺⁾ oscillations and pulsatile insulin secretion in islets from ob/ ob mice. *Diabetologia* 45, 1154-1163.
- Reddy, A., Caler, E. V., and Andrews, N. W. (2001). Plasma membrane repair is mediated by Ca⁽²⁺⁾-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell* 106, 157-169.
- 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, 1275-1284.
- 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, 7662-7673.

- Renstrom, E., Barg, S., Thevenod, F., and Rorsman, P. (2002). Sulfonylurea-mediated stimulation of insulin exocytosis via an ATP-sensitive K⁺ channel-independent action. *Diabetes* 51 Suppl 1, S33-36.
- Rickman, C., and Davletov, B. (2003). Mechanism of calcium-independent synaptotagmin binding to target SNAREs. *J. Biol. Chem.* 278, 5501-5504.
- 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, 12574-12579.
- Rickman, C., Craxton, M., Osborne, S., and Davletov, B. (2004b). Comparative analysis of tandem C2 domains from the mammalian synaptotagmin family. *Biochem. J.* 378, 681-686.
- Robinson, I. M., Ranjan, R., and Schwarz, T. L. (2002). Synaptotagmins I and IV promote transmitter release independently of Ca(2+) binding in the C(2)A domain. *Nature* 418, 336-340.
- Rorsman, P., Eliasson, L., Renstrom, E., Gromada, J., Barg, S., and Gopel, S. (2000a). The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion. *News Physiol. Sci.* 15, 72-77.

S

- 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, 1019-1028.
- 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- 33027.
- 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, 24499-24505.
- Scales, S. J., Yoo, B. Y., and Scheller, R. H. (2001). The ionic layer is required for efficient dissociation of the SNARE complex by alpha-SNAP and NSF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 14262-14267.
- 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, 733-736.
- 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. USA* 93, 13327-13332.
- Schimmoller, F., Simon, I., and Pfeffer, S. R. (1998). Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J. Biol. Chem.* 273, 22161-22164.
- Schneggenburger, R., and Neher, E. (2000). Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse. *Nature* 406, 889-893.

- 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, 1117-1122.
- Schuit, F., De Vos, A., Farfari, S., Moens, K., Pipeleers, D., Brun, T., and Prentki, M. (1997). Metabolic fate of glucose in purified islet cells. Glucose-regulated anaplerosis in beta cells. *J. Biol. Chem.* 272, 18572-18579.
- 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, 3987-3995.
- Schulze, K. L., Broadie, K., Perin, M. S., and Bellen, H. J. (1995). Genetic and electrophysiological studies of *Drosophila* syntaxin-1A demonstrate its role in nonneuronal secretion and neurotransmission. *Cell* 80, 311-320.
- Schweizer, A., Ericsson, M., Bachi, T., Griffiths, G., and Hauri, H. P. (1993). Characterization of a novel 63 kDa membrane protein. Implications for the organization of the ER-to-Golgi pathway. *J. Cell. Sci.* 104 (Pt 3), 671-683.
- Sekine, N., Cirulli, V., Regazzi, R., Brown, L. J., Gine, E., Tamarit-Rodriguez, J., Girotti, M., Marie, S., MacDonald, M. J., Wollheim, C. B., and 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, 4895-4902.
- Shao, X., Fernandez, I., Sudhof, T. C., and Rizo, J. (1998). Solution structures of the Ca²⁺-free and Ca²⁺-bound C2A domain of synaptotagmin I: does Ca²⁺ induce a conformational change? *Biochemistry* 37, 16106-16115.
- Shin, O. H., Rhee, J. S., Tang, J., Sugita, S., Rosenmund, C., and Sudhof, T. C. (2003). Sr²⁺ binding to the Ca²⁺ binding site of the synaptotagmin 1 C2B domain triggers fast exocytosis without stimulating SNARE interactions. *Neuron* 37, 99-108.
- Shin, O. H., Maximov, A., Lim, B. K., Rizo, J., and Sudhof, T. C. (2004). Unexpected Ca²⁺-binding properties of synaptotagmin 9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 2554-2559.
- Shirataki, H., Kaibuchi, K., Sakoda, T., Kishida, S., Yamaguchi, T., Wada, K., Miyazaki, M., and Takai, Y. (1993). Rabphilin-3A, a putative target protein for smg p25A/rab3A p25 small GTP-binding protein related to synaptotagmin. *Mol. Cell. Biol.* 13, 2061-2068.
- Sollner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H., and Rothman, J. E. (1993). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75, 409-418.
- Song, S. H., McIntyre, S. S., Shah, H., Veldhuis, J. D., Hayes, P. C., and Butler, P. C. (2000). Direct measurement of pulsatile insulin secretion from the portal vein in human subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 4491-4499.
- Straub, S. G., and Sharp, G. W. (2002). Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 18, 451-463.
- Sudhof, T. C. (2002). Synaptotagmins: why so many? *J. Biol. Chem.* 277, 7629-7632.
- Sugita, S., Han, W., Butz, S., Liu, X., Fernandez-Chacon, R., Lao, Y., and Sudhof, T. C. (2001). Synaptotagmin VII as a plasma membrane Ca(2+) sensor in exocytosis. *Neuron* 30, 459-473.

- Sugita, S., Shin, O. H., Han, W., Lao, Y., and Sudhof, T. C. (2002). Synaptotagmins form a hierarchy of exocytotic Ca(2+) sensors with distinct Ca(2+) affinities. *EMBO J.* 21, 270-280.
- 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 Ca2+/phospholipid-binding fold. *Cell* 80, 929-938.
- 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, 347-353.

T

- Taraska, J. W., Perrais, D., Ohara-Imaizumi, M., Nagamatsu, S., and Almers, W. (2003). Secretory granules are recaptured largely intact after stimulated exocytosis in cultured endocrine cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 2070-2075.
- Thompson, C. C. (1996). Thyroid hormone-responsive genes in developing cerebellum include a novel synaptotagmin and a hairless homolog. *J. Neurosci.* 16, 7832-7840.
- 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.
- 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 Ca2+-regulated membrane fusion by synaptotagmin and SNAREs. *Science* 304, 435-438.

U

- Ubach, J., Zhang, X., Shao, X., Sudhof, T. C., and Rizo, J. (1998). Ca2+ binding to synaptotagmin: how many Ca2+ ions bind to the tip of a C2-domain? *EMBO J.* 17, 3921-3930.
- Ubach, J., Lao, Y., Fernandez, I., Arac, D., Sudhof, T. C., and Rizo, J. (2001). The c(2)b domain of synaptotagmin i is a ca(2+)-binding module. *Biochemistry* 40, 5854-5860.
- Ullrich, B., and Sudhof, T. C. (1995). Differential distributions of novel synaptotagmins: comparison to synapsins. *Neuropharmacology* 34, 1371-1377.

V

- Vallar, L., Biden, T. J., and Wollheim, C. B. (1987). Guanine nucleotides induce Ca2+-independent insulin secretion from permeabilized RINm5F cells. *J. Biol. Chem.* 262, 5049-5056.
- 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, 353-357.

- 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. USA* 92, 2164-2168.
- Von Poser, C., Ichtchenko, K., Shao, X., Rizo, J., and Sudhof, T. C. (1997). The evolutionary pressure to inactivate. A subclass of synaptotagmins with an amino acid substitution that abolishes Ca²⁺ binding. *J. Biol. Chem.* 272, 14314-14319.
- Von Poser, C., Zhang, J. Z., Mineo, C., Ding, W., Ying, Y., Sudhof, T. C., and Anderson, R. G. (2000). Synaptotagmin regulation of coated pit assembly. *J. Biol. Chem.* 275, 30916-30924.
- Von Poser, C., and Sudhof, T. C. (2001). Synaptotagmin 13: structure and expression of a novel synaptotagmin. *Eur. J. Cell. Biol.* 80, 41-47.

W

- Wang, X., Cahill, C. M., Pineyro, M. A., Zhou, J., Doyle, M. E., and Egan, J. M. (1999). Glucagon-like peptide-1 regulates the beta cell transcription factor, PDX-1, in insulinoma cells. *Endocrinology* 140, 4904-4907.
- Wang, Y., Thiele, C., and Huttner, W. B. (2000). Cholesterol is required for the formation of regulated and constitutive secretory vesicles from the trans-Golgi network. *Traffic* 1, 952-962.
- Wang, C.-T., Grishanin, R., Earles, C. A., Chang, P. Y., Martin, T. F. J., Chapman, E. R., and Jackson, M. B. (2001). Synaptotagmin Modulation of Fusion Pore Kinetics in Regulated Exocytosis of Dense-Core Vesicles. *Science* 294, 1111-1115.
- Wang, P., Wang, C. T., Bai, J., Jackson, M. B., and Chapman, E. R. (2003). Mutations in the effector binding loops in the C2A and C2B domains of synaptotagmin I disrupt exocytosis in a non-additive manner. *J. Biol. Chem.* 278, 47030-47037.
- Waters, M. G., and Hughson, F. M. (2000). Membrane tethering and fusion in the secretory and endocytic pathways. *Traffic* 1, 588-597.
- 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, 759-772.
- Wei, S., Xu, T., Ashery, U., Kollwe, A., Matti, U., Antonin, W., Rettig, J., and Neher, E. (2000). Exocytotic mechanism studied by truncated and zero layer mutants of the C-terminus of SNAP-25. *EMBO J.* 19, 1279-1289.
- Welling, G. W., Weijer, W. J., van der Zee, R., and Welling-Wester, S. (1985). Prediction of sequential antigenic regions in proteins. *FEBS Lett.* 188, 215-218.
- Welsh, M., Scherberg, N., Gilmore, R., and Steiner, D. F. (1986). Translational control of insulin biosynthesis. Evidence for regulation of elongation, initiation and signal-recognition-particle-mediated translational arrest by glucose. *Biochem. J.* 235, 459-467.
- Wheeler, M. B., Sheu, L., Ghai, M., Bouquillon, A., Grondin, G., Weller, U., Beaudoin, A. R., Bennett, M. K., Trimble, W. S., and Gaisano, H. Y. (1996). Characterization of SNARE protein expression in β cell lines and pancreatic islets. *Endocrinology* 137, 1340-1348.

- Wick, P. F., Senter, R. A., Parsels, L. A., Uhler, M. D., and Holz, R. W. (1993). Transient transfection studies of secretion in bovine chromaffin cells and PC12 cells. Generation of kainate-sensitive chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 268, 10983-10989.
- Wiedenmann, B., Franke, W. W., Kuhn, C., Moll, R., and Gould, V. E. (1986). Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 3500-3504.
- Wilson, J. D., Foster D. W., Kronenberg H. M., Reed Larsen P. (1998) William's text book of endocrinology. Ed. W. B. Saunders
- Wiser, O., Trus, M., Hernandez, A., Renstrom, E., Barg, S., Rorsman, P., and Atlas, D. (1999). The voltage-sensitive Lc-type Ca²⁺ channel is functionally coupled to the exocytotic machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 248-253.
- 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. USA* 100, 2082-2087.

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, 671-682.
- Yedovitzky, M., Mochly-Rosen, D., Johnson, J. A., Gray, M. O., Ron, D., Abramovitch, E., Cerasi, E., and Nesher, R. (1997). Translocation inhibitors define specificity of protein kinase C isoenzymes in pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.* 272, 1417-1420.

Z

- 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, 751-760.
- Zhang, X., Rizo, J., and Sudhof, T. C. (1998). Mechanism of phospholipid binding by the C2A-domain of synaptotagmin I. *Biochemistry* 37, 12395-12403.
- 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), 1345-1351.
- Zhang, W., Efanov, A., Yang, S. N., Fried, G., Kolare, S., Brown, H., Zaitsev, S., Berggren, P. O., and Meister, B. (2000). Munc-18 associates with syntaxin and serves as a negative regulator of exocytosis in the pancreatic beta -cell. *J. Biol. Chem.* 275, 41521-41527.
- Zhang, W., Khan, A., Ostenson, C. G., Berggren, P. O., Efendic, S., and Meister, B. (2002a). Down-regulated expression of exocytotic proteins in pancreatic islets of diabetic GK rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 1038-1044.
- Zhang, X., Kim-Miller, M. J., Fukuda, M., Kowalchyk, J. A., and Martin, T. F. (2002b). Ca²⁺-dependent synaptotagmin binding to SNAP-25 is essential for Ca²⁺-triggered exocytosis. *Neuron* 34, 599-611.

Zhang, Q., Fukuda, M., Van Bockstaele, E., Pascual, O., and Haydon, P. G. (2004). Synaptotagmin IV regulates glial glutamate release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *101*, 9441-9446.

RÉSUMÉ

La libération de l'insuline dans le milieu extracellulaire nécessite la fusion d'une vésicule large à cœur dense (VLCD) avec la membrane plasmique. Ce phénomène, appelé exocytose, est déclenché par une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium. Le senseur calcique des cellules β pancréatiques n'est pas strictement connu, cependant une famille de protéines, les Synaptotagmines (Syt) est impliquée dans cette fonction dans les neurones. Afin de caractériser cette famille de protéines dans les cellules insulino-sécrétoires, nous avons produit des anticorps mono-spécifiques des isoformes Syt 8 à Syt 11 et Syt 13. Grâce à ces anticorps et par des techniques de fractionnement cellulaire et d'immunofluorescence nous avons pu établir (1) que l'isoforme Syt 8 a un comportement biochimique de protéine cytosolique (2) que Syt 10 est exprimée dans les cellules primaires du pancréas endocrine, dans les neurones d'hippocampe et dans les cellules chromaffines, mais pas dans les lignées clonales insulino-sécrétoires (3) que Syt 11 et Syt 13 sont exprimées dans les cellules insulino-sécrétoires (4) que Syt 11 est localisée, dans les cellules β pancréatiques, dans un compartiment précoce de la voie de sécrétion qui pourrait être le compartiment intermédiaire (5) Syt 9, mais pas Syt 7, est localisée sur les VLCD et pourrait donc jouer le rôle de senseur calcique de la sécrétion d'insuline.

En conclusion, ce travail a permis de caractériser plus précisément la distribution des isoformes des Syt dans les cellules insulino-sécrétoires. Grâce aux anticorps spécifiques et au travail de localisation nous avons ouvert la voie des études fonctionnelles de cette famille de protéines qui semble impliquée dans toutes les étapes du transport vésiculaire.

MOTS-CLEFS : Insuline, Cellules β -Pancréatiques, Calcium, Synaptotagmines, Immunofluorescence

SUMMARY

Insulin is released into the extracellular space by fusion of Large Dense Core Vesicles (LDCV) with the plasma membrane. This process, called exocytosis, is triggered by a rise in intracellular calcium. In pancreatic β cells, the principal calcium sensor is currently not precisely known. In neurons a family of proteins, the Synaptotagmins (Syt), play a central role in triggering exocytosis. 16 Syt are known and the elucidation of their subcellular localisation is a prerequisite for functional studies. To further characterise this family in pancreatic β cells, we have used commercial antibodies as well as produced and thoroughly characterized specific antibodies against Syt 8 to Syt 11 and Syt 13. Using subcellular fractionation and immunofluorescence we have established that (1) Syt 8 is expressed as a soluble protein in endocrine cells, (2) Syt 10 is expressed in primary endocrine pancreatic β cells, hippocampal neurons and chromaffin cells but not in clonal insulin-secreting cells, (3) Syt 11 and Syt 13 are expressed in insulin-secreting cells, (4) in pancreatic β cells Syt 11 is localised in an early compartment of the secretory pathway, which could be the intermediate compartment, (5) Syt 9, but not Syt 7, is present on LDCV and may therefore play a major role in triggering exocytosis of insulin-containing vesicles.

In conclusion, using specific polyclonal antibodies, we have characterised the distribution of synaptotagmin isoforms in insulin-secreting cells. The observed distribution suggest that this family of protein may be implicated in several steps of intracellular vesicular transport. Functional studies are now to be undertaken in order to precisely describe the role of each isoform.

KEY-WORDS : Insulin, β -Pancreatic cells, Calcium, Synaptotagmins and Immunofluorescence