Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité : **Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Étude des mécanismes moléculaires régissant la sécrétion neuroendocrine : rôle de l'interaction entre la chromogranine A et l'acide phosphatidique dans la formation et l'exocytose des granules de sécrétion

Présentée et soutenue par
Fanny LAGUERRE

Thèse soutenue publiquement le 28 mai 2021 devant le jury composé de		
Mme GUÉRINEAU Nathalie	Directrice de Recherche CNRS, Institut de Génomique Fonctionnelle (IGF), UMR CNRS 5203, INSERM U1191, Université de Montpellier	Rapporteur
Mr GASMAN Stéphane	Directeur de Recherche INSERM, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (INCI), UPR CNRS 3212, Université de Strasbourg	Rapporteur
Mme ROVÈRE Carole	Chargée de Recherche CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC), UMR CNRS 7275, Université de Nice Sophia Antipolis	Examinateur
Mr LESOUHAITIER Olivier	Professeur, Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM), EA 4312, Université de Rouen Normandie	Examinateur
Mr ANOUAR Youssef	Directeur de Recherche INSERM, Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine (DC2N), Inserm U1239, Université de Rouen Normandie	Examinateur
Mr RENARD Pierre-Yves	Professeur, Laboratoire de Chimie Organique, Bio-organique, Réactivité et Analyse (COBRA), UMR CNRS 6014, Université de Rouen Normandie	Co-directeur de thèse
Mme MONTERO-HADJADJE Maïté	Professeure, Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine (DC2N), Inserm U1239, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Maïté MONTERO-HADJADJE, Unité INSERM 1239, Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine (DC2N), Université de Rouen Normandie

UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

Inserm
La science pour la santé
From science to health

DC2N

« Je ne voulais pas juste connaître les noms des choses.
Je me souviens vraiment vouloir savoir comment tout cela fonctionne. »

Elizabeth Blackburn

Table des matières

Table des matières 1

Remerciements 4

Publications & communications relatives à ma formation doctorale 7

Résumé 10

Abstract 11

Liste des abréviations 12

Liste des figures 14

Avant-propos 16

Partie I : Introduction 18

I. La sécrétion des cellules neuroendocrines 18

I.1 La sécrétion constitutive 19

I.2 La sécrétion régulée 20

I.3 Mécanismes moléculaires de la sécrétion régulée 21

II. La voie de sécrétion régulée des cellules neuroendocrines 27

II.1 Agrégation et tri des protéines au niveau du réseau *trans*-golgien 27

II.2 Transport et maturation des granules de sécrétion 29

II.2.1 Transport 29

II.2.2 Maturation 30

II.2.2.1 Fusion homotypique 30

II.2.2.2 Sorting by retention 32

II.2.2.3 Acidification 32

III. La biogénèse des granules de sécrétion à cœur dense 33

III.1 Rôle des granines 33

III.1.1 Présentation des granines 33

III.1.2 La chromogranine A 34

III.1.2.1 Structure et organisation de la protéine, structure du gène 34

III.1.2.2 Modifications post-traductionnelles 37

III.1.2.3 Rôles dans la biogénèse des GSCD et dans la sécrétion régulée 38

III.2 Rôle du pH 38

III.3 Rôle du calcium 39

III.4 Rôle des protéines solubles 41

III.5 Rôle des protéines et récepteurs membranaires 42

III.6 Rôle des protéines cytosoliques 44

III.7 Rôle des modifications post-traductionnelles 46

IV. Rôles des lipides membranaires dans la voie de sécrétion régulée..... 48

IV.1 Importance des lipides membranaires..... 48

IV.2 Les lipides de la membrane golgienne 49

IV.3 Les lipides impliqués dans la formation des GSCD 50

IV.3.1 Rôle du cholestérol 50
IV.3.2 Rôle des phosphoinositides 52
IV.3.3 Rôle de l'acide phosphatidique (PA) 52
IV.3.3.1 Voies de synthèse du PA 53
IV.3.3.2 Focalisation sur la phospholipase D (PLD) 56
IV.3.3.2.1 Identification 56
IV.3.3.2.2 Structure 58
IV.3.3.2.3 Localisation subcellulaire 59
IV.3.3.3 Rôle du PA dérivé de l'activité de la PLD 61

IV.4 Interaction entre l'acide phosphatidique et les protéines..... 62

IV.4.1 Identification des domaines de liaison au PA au sein des protéines 63
IV.4.2 Influence de la topologie et de l'environnement lipidique sur la liaison au PA..... 66
IV.4.3 Influence des charges portées par les membranes, du pH et des concentrations calciques sur la liaison au PA 68
IV.4.4 Influence du mécanisme de commutation de liaison électrostatique-hydrogène et du pH sur la liaison au PA..... 70
IV.4.5 Influence des insaturations du PA sur la liaison avec les PABD..... 71

V. Couplage exocytose–endocytose dans les cellules neuroendocrines. 72

V.1 Différentes formes d'endocytose compensatrice..... 74

V.1.1 Endocytose dépendante de la clathrine..... 74
V.1.2 Endocytose indépendante de la clathrine 76

V.2 Mécanismes moléculaires du couplage exocytose-endocytose..... 77

V.2.1 Le calcium cytosolique..... 77
V.2.2 Les lipides 80
V.2.2.1 Rôle du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 80
V.2.2.2 Rôle de la phosphatidylsérine..... 80
V.2.2.3 Rôle du diacylglycérol..... 81
V.2.3 Le cytosquelette..... 81
V.2.4 Les protéines SNARE, la dynamine et l'oligophrénine-1 82

VI. Objectifs de l'étude 84

Partie II : Résultats 86

I. Article 1 86

II. Article 2 (en préparation)..... 110

Partie III : Discussion & résultats complémentaires 130

I. L'interaction de la CgA avec le PA de la membrane golgienne induit une déformation membranaire contribuant au bourgeonnement des GSCD 131

II. La sécrétion régulée des cellules neuroendocrines entraîne la présence de CgA au niveau des sites exocytiques 136

III. La taille et la nature du fluorochrome porté par les analogues de PA conditionnent leur insertion et leur suivi au sein des cellules vivantes..... 142

Partie IV : Conclusions & perspectives 147

Partie V : Matériels & méthodes 152

I. Article 1 152

I.1 Culture cellulaire et transfection 152

I.2 Mutagénèse dirigée : génération de la CgA dépourvue du domaine d'interaction avec le PA 153

I.3 Techniques biochimiques 154
I.3.1 Extraction protéique 154
I.3.2 Western-Blot 155
I.3.3 Test de liaison entre la CgA et les phospholipides membranaires 155

I.4 Préparation des liposomes géants (Giant Unilamelar Vesicles ou GUV) et couplage de la CgA à l'Alexa 488 156

I.5 Immunocytochimie 160

I.6 Techniques de microscopie 161
I.6.1 Microscopie confocale SP8 161
I.6.2 Microscopie confocale SP5 161

I.7 Analyse post-acquisition *via* Imaris 162

II. Article 2 (en préparation) 163

II.1 Culture primaire de cellules chromaffines bovines 163

II.2 Techniques biochimiques 165
II.2.1 Stimulation des cellules et suivi de l'externalisation de la CgA par immunocytochimie couplée à la microscopie confocale 165
II.2.2 Stimulation des cellules et suivi de l'externalisation de la CgA par western blot 167
II.2.3 Étude de la sécrétion de CgA suite au traitement des cellules par le FIPI 168
II.2.4 Étude de la sécrétion des CAs suite au traitement des cellules par le FIPI 168

III. Résultats complémentaires : conditions d'internalisation du PA-NBD ou PA-TMR in cellulo 169

Références bibliographiques 172

Liste des publications annexes 208

Remerciements

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au sein du laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine (DC2N), Unité INSERM 1239, dirigé par le Dr. Youssef ANOUAR, au sein de l'Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale (IRIB) de l'université de Rouen Normandie.

Ce travail a été financé par la région Normandie et a également bénéficié de l'aide généreuse de différents organismes :

- *L'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)*
- *L'Université de Rouen Normandie*
- *L'Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale (IRIB)*
- *L'École Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement (ED nBISE)*
- *La Fondation pour la Recherche Médicale (FRM)*
- *L'Agence Nationale de Recherche (ANR)*

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse,

*Le **Dr Nathalie GUÉRINEAU**, Directeur de Recherche à l'Institut de Génomique Fonctionnelle de Montpellier, et le **Dr Stéphane GASMAN**, Directeur de Recherche à l'Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives de Strasbourg qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir être rapporteur de ce travail. Je tiens à les remercier très sincèrement pour leur présence aujourd'hui et l'expertise qu'ils pourront apporter à nos travaux.*

*Merci également au **Pr Olivier LESOUHAITIER**, Professeur à l'Université de Rouen Normandie d'avoir bien voulu examiner ce manuscrit. Merci pour sa présence aujourd'hui dans mon jury.*

*Un grand merci au **Dr Carole ROVÈRE**, Chargée de Recherche à l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire de Nice, d'avoir accepté d'être référente de mon Comité de Suivi Individuel (CSI) pendant la thèse et d'avoir bien voulu examiner ces travaux. Je la remercie chaleureusement pour sa disponibilité, ses conseils, ses encouragements pendant les CSI et pour sa présence aujourd'hui dans mon jury.*

*Je remercie chaleureusement le **Dr Youssef ANOUAR**, Directeur de Recherche et directeur du laboratoire DC2N de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je tiens à lui témoigner ici toute ma gratitude pour la confiance qu'il m'a accordée, pour ses encouragements et ses critiques constructives dont j'ai bénéficié tout au long de la thèse.*

*Le **Pr Pierre-Yves RENARD**, mon co-directeur. Merci pour ta rigueur, ta disponibilité et pour les réunions toujours constructives, qui ont permis à une petite biologiste de voir un peu plus clair dans le monde complexe des lipides. Merci pour ta présence aujourd'hui dans mon jury.*

*Le **Pr Maïté MONTERO**, ma directrice. Par où commencer… Voici la fin d'une looooooooongue aventure que l'on a partagée ensemble. Mille mercis de m'avoir fait confiance dès mon arrivée en L3, de m'avoir encadrée toutes ces années. Tu as su m'encourager en me laissant*

la liberté d'apprendre par moi-même lorsque j'avais de nouvelles idées. Tu as été une cheffe formidable, toujours à l'écoute, pleine d'encouragements, en essayant d'être disponible un maximum malgré toutes les contraintes de ton emploi du temps et en répondant à mes (très) nombreuses questions permanentes. Tu as également su me rassurer quand le doute me gagnait, en me poussant à toujours aller de l'avant. Tu as su me transmettre ton amour pour la recherche et ta rigueur scientifique. Grâce à la confiance que tu m'as accordée (que ce soit pour la recherche ou l'enseignement) et à notre entente (malgré mon caractère bien trempé), j'ai gagné en assurance et en maturité. Je garderai un bon souvenir de cette période difficile qu'est le doctorat, je suis fière du travail accompli et je suis reconnaissante d'avoir réalisé ma thèse avec toi. Maité, merci pour tout.

Je voudrais ensuite remercier les membres (actuels et anciens) de la team CgA,

Lydie, qui m'a supportée dans le bureau dès lors que je n'étais qu'une petite stagiaire. Merci pour ta rigueur, ta disponibilité ainsi que pour tous les conseils et connaissances que tu m'as apportés. Le challenge des chromaffines bovines en ta compagnie n'a pas été simple, mais a été enrichissant et tu vois, j'ai fini par apprécier ces jolies petites cellules ! ;)
Nous avons partagé quelques galères de manipes (sacrées chromaffines…), mais surtout beaucoup de fous rires ! Je ne retiendrai que les fous rires. Merci de m'avoir rassurée lorsque le stress prenait le contrôle de mon petit cerveau et merci d'être toi, tout simplement.

Lina, merci pour les conseils que tu m'as transmis avec ton point de vue de jeune docteure et les connaissances sur les GUVs/SUVs/LUVs, qui représentaient un monde lointain pour une petite biologiste comme moi. Merci pour ta disponibilité et pour ta bonne humeur quotidienne.

Ophélie, je te remercie du fond du cœur. Merci de m'avoir formée à la paillasse alors même que je n'étais qu'une petite L3, merci de m'avoir transmis tes connaissances et merci d'avoir pris le temps de répondre à toutes mes interrogations. Qui de mieux pour comprendre ce que je vis qu'une personne qui vis sensiblement la même chose au quotidien ? On en aura passé du temps ensemble ! Que de bons moments que je n'oublierai pas de sitôt. Si ma thèse s'est déroulée dans d'aussi bonnes conditions, c'est parce que tu m'as donné toutes les clés pour réussir. Ce n'est pas pour autant que j'oublie les représailles en cas de manipes ratées hein… Au fait, Tatouille va bien ;)

Merci également aux stagiaires que j'ai eu l'occasion d'encadrer pendant ma thèse. Je suis désolée pour les premiers qui m'ont servi de cobaye dans mon rôle d'encadrement (j'espère que vous en gardez quand même un bon souvenir ;)) et j'espère avoir pu vous transmettre ma passion pour la recherche. Un merci tout particulier pour Théo qui m'a supporté pendant mes enseignements, pendant la rédaction de ce manuscrit et pendant la préparation de ma soutenance… Merci pour ta joie de vivre, ta compréhension et pour les pauses chocolatées ;). Je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite.

Je remercie particulièrement les membres de l'équipe 1 dont j'ai fait partie,

Merci pour votre aide et vos conseils. Dorthe, merci pour ta précieuse aide pour la biologie moléculaire, pour ta patience lorsque l'on vient toutes les deux minutes dans ton bureau pour des « petites questions » ;) ainsi que pour tout le temps que tu consacres à la réalisation des commandes. Christine, un grand merci pour tes conseils tant sur le plan théorique que pratique. Christophe, merci d'avoir toujours été disponible que ce soit pour discuter recherche, après-thèse ou enseignements. Merci également de m'avoir fait confiance pour les TP de génétique, alors même que je n'étais qu'une petite D1… Alex, merci pour nos discussions, sérieuses et moins

sérieuses… Ainsi que pour ta bonne humeur constante et les coups de main indispensables en informatique. Merci également aux autres membres de l'équipe, Cédric, Isabelle, Anthony, Luca, Loubna, Amine, David, Houssein, Jiyoung et Mirna.

***Je tiens également à remercier**,*

Les membres du laboratoire, trop nombreux pour être cités, qui ont été présents pour moi durant toutes ces années et qui m'ont permis de mener cette thèse dans de bonnes conditions avec toujours le moyen d'avoir une aide au sein du laboratoire.
Merci aux secrétaires, Sabrina et Laurence, de faciliter notre vie au quotidien. Un merci tout particulier pour Catherine, d'avoir toujours été disponibles pour répondre à mes (nombreuses) interrogations, et pour organiser tout à la perfection, lorsque l'on part en congrès.

Un merci tout particulier aux personnes que j'ai le plus côtoyées,

Tout d'abord un graaaaaand merci à Lisa. Cette aventure de la thèse, on l'a faite ensemble. En allant des formations, des joies de l'administration, du labo fermé le 14 juillet et des cafés salvateurs jusqu'à l'indien du mercredi midi et aux fous rires. Merci d'avoir été là, même dans cette dernière période qui a été compliquée pour toutes les deux. Je te souhaite pleins de bonnes choses pour la suite !! Ne t'inquiète pas, je me souviens de ce que je dois faire avant de partir ! ;)

Inès, de ton arrivée en M2 jusqu'à maintenant, tu as toujours été un petit rayon de soleil. Nos discussions sur la sécrétion me manqueront ! Merci d'avoir toujours été disponible et merci de tes sourires au quotidien. Je te souhaite bonne chance pour la fin de l'aventure.

Manue et Mouna, l'aventure de la MNS a été superbe à vos côtés ! Je me rappellerai longtemps notre balade sur la place Jemaa el-Fna ;). Mouna, merci pour ta bonne humeur quotidienne ! J'ai été ravie de partager l'expérience de l'enseignement avec toi.

En parlant d'enseignements, je remercie Marie du fond du cœur. Merci de m'avoir formée, d'avoir toujours été disponible pour répondre à mes nooooombreuses questions (même quand je t'appelais un peu paniquée en plein TP) et merci d'avoir aussi rapidement eu confiance en moi.

Marjo, qu'est-ce que l'on ferait sans toi en TP ? Mille merci d'être autant disponible, de m'avoir sauvée de la centrifugeuse folle et merci pour tes blagues (un peu vaseuses parfois …).

Pour terminer, je remercie infiniment ma famille et mes proches,

Merci à mes amies, avec une pensée particulière pour Camille et Garance pour qui m'ont toujours soutenue. Vous savez toutes les deux ce que c'est qu'une cellule chromaffine, et ça, c'est beau.

Je remercie du fond du cœur les deux femmes de ma vie, ma mère et ma sœur. La fierté et la confiance que vous me donnez n'ont pas de prix. Les encouragements et le soutien dont vous m'avez toujours fait part m'ont poussé à continuer jusqu'ici. Maman, merci de m'avoir toujours motivée à donner le meilleur de moi-même, si j'en suis ici aujourd'hui, c'est en partie grâce à toi.

Enfin je remercie l'homme qui partage ma vie, Thibaut. Durant ces années de Master puis de Doctorat, tu as toujours été d'un soutien sans faille, d'une compréhension sans limites et d'un amour inconditionnel. Je te remercie du plus profond de mon cœur. Je t'aime.

Publications & communications relatives à ma formation doctorale

PUBLICATIONS

-2020-

Chromogranin A preferential interaction with Golgi phosphatidic acid induces membrane deformation and contributes to secretory granule biogenesis

Carmon O*., **Laguerre F*.,** Riachy L*., Delestre-Delacour C., Wang Q., Tanguy E., Jeandel L., Cartier D., Thahouly T., Haeberlé AM., Fouillen L., Rezazgui O., Schapman D., Haefelé A., Goumon Y., Galas L., Renard PY., Alexandre S., Vitale N*., Anouar Y*.and Montero-Hadjadje M*.

**Les auteurs ont contribué de façon équivalente à ce travail.*

Article dans The FASEB journal (2020) 34 : 6769-6790. doi: 10.1096/fj.202000074R.

Chromogranin A in the early steps of the neurosecretory pathway

Laguerre F., Anouar Y and Montero-Hadjadje M.

Revue dans IUBMB Life (2020) 72 : 524-532. doi: 10.1002/iub.2218.

-2017-

Chromogranins as molecular coordinators at the crossroads between hormone aggregation and secretory granules biogenesis

Carmon O., **Laguerre F.,** Jeandel L., Anouar Y. and Montero-Hadjadje M.

Chapitre de livre « Chromogranins: form Cell Biology to Physiology and Biomedicine », Unipa Springer Series, 2017.

Myosin 1b and F-acbn are involved in the control of secretory granule biogenesis

Delestre-Delacour C., Carmon O., **Laguerre F**., Estay-Ahumada C., Courel M., Elias S., Jeandel L., Rayo MV., Peinado JR., Sengmanivong L., Gasman S., Coudrier E., Anouar Y. and Montero-Hadjadje M.

Article dans Scientific Reports (2017) 7 : 5172. doi: 10.1038/s41598-017-05617-1.

PARTICIPATIONS À DES CONGRÈS INTERNATIONAUX, NATIONAUX & LOCAUX

COMMUNICATIONS ORALES

2020-

Contribution of super-resolutive techniques to the understanding of molecular mechanisms governing neuroendocrine secretion
Riachy L., **Laguerre F.,** Jeandel L., Chasserot-Golaz S., Alexandre S., Vitale N., Anouar Y., Montero-Hadjadje M.

Société de Neuroendocrinologie, Rouen (distanciel), France, Décembre 2020

Secretory granule biogenesis is initiated by Chromogranin A interaction with phosphatidic acid
Laguerre F, Riachy L., Carmon O., Delestre-Delacour C., Wang Q., Tanguy E., Fouillen L., Galas L., Renard P-Y., Alexandre S., Vitale N., Anouar Y. and Montero-Hadjadje M.

20th International Symposium on Chromaffin Cell Biology, Chennai, Inde, Janvier 2020

-2019-

The multi-faceted role of Chromogranin A in the neurosecretory process
Laguerre F., Carmon O., Riachy L., Jeandel L., Gasman S., Vitale N., Anouar Y. and Montero-Hadjadje M.

Mediterranean Neuroscience Society, Marrakech, Maroc, Juin 2019

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

-2019-

Chromogranin A – phosphatidic interaction at the origin of the neurosecretory pathway
Laguerre F., Carmon O., Riachy L., Jeandel L., Vitale N., Anouar Y. and Montero-Hadjadje M.

Mediterranean Neuroscience Society, Marrakech, Maroc, Juin 2019
Obtention d'une bourse de voyage (Aide à la mobilité, EdNBISE)

Is deregulation of hormonal secretion at the origin of neuroendocrine tumors?
Laguerre F., Riachy L., Carmon O., Balieu S., Haefelé A., Renard PY., Alexandre S., Vitale N., Anouar Y. and Montero-Hadjadje M.

Journée de l'école doctorale (EdN Bise), Caen, France, Mars 2019

-2018-

The tumorigenic factors PLD-derived phosphatidic acid and Chromogranin A interact to regulate hormone secretion in neuroendocrine cells

Laguerre F., Riachy L., Carmon O., Balieu S., Haefelé A., Renard PY., Alexandre S., Vitale N., Anouar Y. and Montero-Hadjadje M.

Journée Normande de Recherche Biomédicale (JNBb), Rouen, France, Septembre 2018

Chromogranin A potentially controls the biogenesis of secretory granules by interacting with Golgi complex phosphatidic acid

Laguerre F., Carmon O., Rezazgui O., Haefelé A., Renard PY., Vitale N., Anouar Y. and Montero-Hadjadje M.

Club Exocytose-Endocytose, Sant Feliu De Guixols, Espagne, Mai 2018

Obtention d'une bourse de voyage (Aviesan)

Obtention du prix de la meilleure communication affichée

Is there a link between the deregulation of hormone secretion and the onset of neuroendocrine tumors?

Laguerre F., Carmon O., Rezazgui O., Renard PY., Vitale N., Anouar Y. and Montero-Hadjadje M.

Journée de l'école doctorale (EdN Bise), Rouen, France Mars 2018

-2017-

Characterization of the molecular mechanisms involved in the deregulation of hormone secretion in neuroendocrine tumors

Laguerre F., Carmon O., Rezazgui O., Renard PY., Vitale N., Anouar Y. and Montero-Hadjadje M.

Journée Normande de Recherche Biomédicale (JNRb), Caen, France Novembre 2017

Résumé

L'exocytose régulée des cellules neuroendocrines est un mécanisme biologique fondamental finement contrôlé, régissant la libération des hormones dans le milieu extracellulaire suite à la fusion des granules de sécrétion à cœur dense (GSCD) avec la membrane plasmique. Ces organites, générés par bourgeonnement de la membrane du réseau *trans*-golgien (TGN), contiennent des hormones et des neuropeptides ainsi que des glycoprotéines solubles, les granines, et sont donc des acteurs essentiels de l'homéostasie cellulaire. Parmi les granines, la chromogranine A (CgA) joue un rôle majeur dans la biogénèse des GSCD mais les mécanismes moléculaires sous-jacents ne sont pas clairement identifiés. Avant mon arrivée, mon équipe d'accueil démontra que l'expression de la CgA dans des cellules non-endocrines COS7 (dépourvues de GSCD et donc d'exocytose régulée) induit la formation de vésicules ayant les caractéristiques des GSCD et que la délétion des extrémités terminales de la CgA organisées en hélice α réduit significativement la formation de ces vésicules. Les hélices α conférant aux protéines la capacité d'interagir avec les membranes biologiques, nous nous sommes intéressés durant ma thèse à l'interaction entre la CgA et les phospholipides membranaires. Nous avons montré tout d'abord que la CgA interagit spécifiquement avec l'acide phosphatidique (PA), un lipide conique ayant un rôle clé dans la sécrétion régulée neuroendocrine. Ensuite, à l'aide de la spectrométrie de masse LC-MS/MS, nous avons *(i)* identifié les formes de PA prédominantes (PA (36 : 1) et (40 : 6)) et observé qu'elles sont communes dans les membranes golgiennes et granulaires, et *(ii)* démontré que la CgA interagit avec ces formes de PA incluses dans des modèles de membranes artificielles, entraînant la déformation/le remaniement de la membrane de ces modèles. Par ailleurs, une analyse *in silico* de la séquence de la CgA a révélé la présence d'un domaine de liaison au PA (PABD) au niveau de la région C-terminale. Nous avons alors observé que la délétion de cette région altère significativement la liaison de la CgA aux formes de PA préalablement identifiées, ainsi que la formation des GSCD au sein des cellules neuroendocrines. Enfin, l'inhibition génétique ou pharmacologique de la PLD, enzyme responsable de la synthèse du PA au sein de la voie de sécrétion régulée, entraîne une diminution significative du nombre de GSCD formés. Ces travaux montrent pour la première fois l'importance de l'interaction CgA/PA dans la courbure de la membrane du TGN et la formation consécutive des GSCD. Par ailleurs, l'analyse de l'exocytose des GSCD contenant la CgA-GFP à l'aide de la microscopie à ondes évanescentes (TIRFM) ayant révélé une persistance de fluorescence à la membrane plasmique après exocytose, nous avons recherché la présence de la CgA au niveau des sites de fusion des GSCD et l'implication de l'interaction CgA/PA dans le contrôle de l'exocytose régulée. Nous avons ainsi d'ores et déjà montré *(i)* que la stimulation des cellules chromaffines entraîne la présence d'une partie des molécules de CgA au niveau des sites de fusion des GSCD et *(ii)* que l'inhibition de la synthèse du PA produit par la PLD diminue la sécrétion régulée de CgA et des catécholamines.

L'ensemble de ces données obtenues dans le cadre de ma thèse suggère que l'interaction entre la CgA et le PA a un rôle fondamental dans la dynamique des membranes au cours de la biogenèse des GSCD, et ainsi dans la sécrétion des cellules neuroendocrines.

Mots-clés : Sécrétion régulée, Cellule neuroendocrine, Biogénèse des granules de sécrétion.

Abstract

Regulated exocytosis of neuroendocrine cells is a finely controlled fundamental biological mechanism governing the release of hormones into the extracellular medium following the fusion of dense-core secretory granules (DCSG) with the plasma membrane. These organelles, generated by budding from the trans-golgian network (TGN) membrane, contain hormones and neuropeptides as well as soluble glycoproteins, granins, and are therefore essential actors of cell homeostasis. Among granins, chromogranin A (CgA) plays a major role in DCSG biogenesis, but the underlying molecular mechanisms are not clearly identified. Previously, my team demonstrated that CgA expression in non-endocrine COS7 cells (devoid of DCSG and therefore of regulated exocytosis) induces the formation of vesicles with DCSG characteristics and that the deletion of CgA α helix terminal regions reduce significantly the formation of these vesicles. Since α helices ensure that proteins interact with biological membranes, we were interested in the interaction between CgA and membrane phospholipids during my thesis. We first showed that CgA interacts specifically with phosphatidic acid (PA), a conical lipid with a key role in the regulated neuroendocrine secretion. Then, using LC-MS/MS mass spectrometry, we *(i)* identified PA predominant forms (PA (36: 1) and (40: 6)) and observed that they are common in Golgi and granular membranes, *(ii)* demonstrated that CgA interacts with those PA forms inserted in artificial membrane models, leading to the deformation/remodeling of these membrane models. Furthermore, *in silico* analysis of the CgA sequence revealed the presence of a PA-binding domain (PABD) at the level of its C-terminal region. Then, we observed that the deletion of this region significantly alters CgA binding to PA forms previously identified, as well as the formation of DCSG within neuroendocrine cells. Finally, the genetic or pharmacological inhibition of PLD, the enzyme involved in PA synthesis within the regulated secretory pathway, results in a significant decrease of the DCSG number. This work shows for the first time the importance of CgA/PA interaction in the curvature of the TGN membrane and the resulting DCSG biogenesis. Furthermore, the analysis of the exocytosis of CgA-GFP containing DCSG using Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (TIRFM) showing a persistent fluorescence at the plasma membrane after exocytosis, we looked for the presence of CgA at DCSG fusion sites and the involvement of CgA/PA interaction in the control of regulated exocytosis. Thus, we have already shown *(i)* that chromaffin cell stimulation leads to the presence of CgA molecules at the level of DCSG fusion sites and *(ii)* that the inhibition of PA synthesis through PLD decreases the regulated secretion of CgA and catecholamines.

Altogether, these data obtained during my thesis suggest that the interaction between CgA and PA has a fundamental role in membrane dynamics during DCSG biogenesis, and thus in neuroendocrine cell secretion.

Keywords: Regulated secretion, Neuroendocrine cell, Secretory granule biogenesis.

Liste des abréviations

Abréviations	Significations
ABP	Actin-Binding Protein = Protéine de liaison à l'actine
ACh	AcétylCholine
AG	Appareil de Golgi
AP-1	Adaptor Protein 1 = Protéine adaptatrice 1
ARF	ADP-Ribosylation Factor
AtT20	Lignée cellulaire dérivant d'une tumeur hypophysaire de souris
BAR	Bin-Amphiphysin-Rvs
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BSA	Bovin Serum Albumin
CgA	Chromogranine A
CgB	Chromogranine B
Cgs	Chromogranines
CL	CardioLipine
COS7	Lignée cellulaire fibroblaste-like dérivant de tissu rénal de singe
CPE	CarboxyPeptidase E
CRE	cAMP Response Element
DAG	Diacylglycérol
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DBH	Dopamine-β-Hydroxylase
DHAP	DihyDroxyAcétone Phosphate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
Drp1	Dynamin-Related Protein 1
Dvl	Disheveled
EGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
FAPP1/2	Four-Phosphate-Adaptator protein 1 ou 2
FIPI	5-Fluoro-2-indolyl des-chlorohalopemide
FCS	Fluorescence Correlation Spectroscopy
G-3-P	Glycérol 3-Phosphate
GSCD	Granule de Sécrétion à Cœur Dense
GSI	Granule de Sécrétion Immature
GSM	Granule de Sécrétion Mature
GUV	Giant Unilamellar Vesicles
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HRP	HorseRadish Peroxidase = Peroxydase de Raifort
HS	Horse Serum = Sérum de cheval
IP3	Inositol Triphosphate
IP3R	Inositol Triphosphate Receptor
ITSN	Intersectine
LB	Lysogeny Broth
LH	Luteinizing Hormone = Hormone Lutéinisante
LN	Solution de Locke Normal
LPA	Lysophosphatidic Acid = Acide lysophosphatidique
LPPAT	Acide lysophosphatidique acetyltransferase
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MIN6	Lignée cellulaire dérivant de cellules β
N-WASP	Neural Wiskott–Aldrich Syndrome Protein

NBD	NitroBenzoxaDiazole
NDS	Normal Donkey Serum
NSF	N-ethylmaleimide Sensitive Factor
OPHN1	Oligophréline 1
PA	Phosphatidic Acid = Acide phosphatidique
PABD	PA – Binding Domain = Domaine de liaison au PA
PACAP	Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide
PACS-1	Phosphofurin Acidic Cluster Sorting protein 1
PAM	Peptidylglycine α-Amidating Monooxygenase
PAP	Acide phosphatidique Phosphohydrolase
PC	Pro-hormone Convertase
PC12	Lignée cellulaire dérivant d'un phéochromocytome de rat
PE	PhosphatidylÉthanolamine
PFA	ParaFormAldéhyde
PG	PhosphatidylGlycérol
PH	Pleckstrin Homology = Domaine d'homologie à la pleckstrine
PI	Phosphoinositides
PI 4-kinase	Phosphatidylinositol 4-kinase
PI(4,5)P2 ou PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PI(4)P	PhosphatidylInositol-4-Phosphate
PKA	Protéine Kinase A
PLA	PhosphoLipase A
PLD	PhosphoLipase D
PLSCR-1	Phospholipid Scramblase 1
POMC	Pro-OpioMélanoCortine
PRC	Puit Recouvert de Clathrine
PS	PhosphatidylSérine
PVA	PolyVinyl Alcohol = Alcool polyvinylique
PX	Domaine d'homologie à PHOX
RER	Réticulum Endoplasmique Rugueux
RIM	Rab3 Interacting Molecule
SgII	Sécrétogranine II
SgIII	Sécrétogranine III
SgIV	Sécrétogranine IV
SgV	Sécrétogranine V
SgVI	Sécrétogranine VI
SgVII	Sécrétogranine VII
SgVIII	Sécrétogranine VIII
SLMV	Synaptic - Like MicroVesicles = Microvésicules de type synaptique
SM	SphingoMyéline
SNARE	Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TGN	*Trans*-Golgi Network = Réseau *trans*-golgien
TIRFM	*Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy*
TMR	*TetraMethylRhodamine*
TRP	Transient Receptor Potential
VAChT	Vesicular Acetylcholine Transporter = Transporteur vésiculaire de l'acétylcholine
VCL	Vésicules Constitutive-Like
VMAT	Vesicular MonoAmine Transporter = Transporteur vésiculaire des monoamines
VS	Vésicule Synaptique

Liste des figures

Figure n°1 : Les voies de sécrétion de la cellule neuroendocrine **19**
Figure n°2 : Schéma simplifié des différentes étapes de l'exocytose **22**
Figure n°3 : Représentation schématique du modèle de fermeture éclair dirigé par les SNAREs permettant la mise en place de l'étape d'arrimage puis conduisant à la fusion des compartiments **24**
Figure n°4 : Les deux modèles de fusion membranaire **26**
Figure n°5 : Schéma récapitulant les différentes alternatives permettant la fusion d'un GSCD avec la membrane plasmique **27**
Figure n°6 : Hypothèses relatant le tri des protéines destinées à la voie de sécrétion régulée **29**
Figure n°7 : Schéma récapitulant les étapes de maturation des GSCD **31**
Figure n°8 : Structure du gène, du transcrit, de la protéine et des peptides biologiquement actifs dérivés de la CgA **35**
Figure n°9 : Position des modifications post-traductionnelles de la *b*CgA (CgA bovine)..... **37**
Figure n°10 : Effet du pH sur la distribution subcellulaire de la CgA **38**
Figure n°11 : Modèle illustrant l'action de l'interaction entre l'IP3R et la CgA/CgB sur des GSCD matures et immatures **40**
Figure n°12 : L'inhibition de l'expression de AQP1 entraîne une diminution du nombre de GSCD **42**
Figure n°13 : Proportion des principaux phospholipides et du cholestérol au sein des organites de cellules mammaliennes **49**
Figure n°14 : Structure des rafts lipidiques identifiés au sein de la membrane plasmique... **51**
Figure n°15 : Exemple de structure chimique de l'acide phosphatidique **53**
Figure n°16 : Principales voies de synthèse du PA au sein des cellules mammaliennes **54**
Figure n°17 : Hydrolyse de la phosphatidylcholine par la PLD et modification de la géométrie lipidique **55**
Figure n°18 : Structure primaire et isoformes des phospholipases D1 (PLD1) et D2 (PLD2) humaine **57**
Figure n°19 : Localisation subcellulaire des PLD1, PLD2 et de la mitoPLD (PLD6) **60**
Figure n°20 : Caractéristiques des partenaires liants le PA et les PLD **64**
Figure n°21 : Exemple de représentation d'un domaine de liaison à l'acide phosphatidique (PABD) **65**

Figure n°22 : Modèle de commutation de liaison électrostatique-hydrogène permettant l'augmentation des charges négatives portées par le PA.....**67**
Figure n°23 : Impact de la phosphatidyléthanolamine (PE) et du cholestérol dans la liaison des protéines présentant un PABD au PA.....**68**
Figure n°24 : Observation en microscopie électronique de l'exocytose full fusion *(A)*, kiss-and-run *(B)* et d'une endocytose clathrine – dépendante *(C)* **73**
Figure n°25 : Différentes étapes du couplage exocytose régulée-endocytose compensatrice **74**
Figure n°26 : Décroissance de la capacité membranaire au niveau d'un site de fusion en raison de l'endocytose clathrine dépendante ou indépendante.....**76**
Figure n°27 : Modèle du mécanisme d'endocytose clathrine-dépendante se réalisant « partie par partie ».....**77**
Figure n°28 : Modèle de l'implication de l'intersectine 1 (ITSN1) dans le couplage exocytose – endocytose des cellules neuroendocrines.....**79**
Figure n°29 : Rôle des microtubules originaires de l'aire golgienne dans l'exocytose et endocytose compensatrice rapide dépendante de la clathrine.....**82**
Figure n°30 : Schéma récapitulant le rôle de l'interaction CgA/PA et des principaux acteurs moléculaires dans le bourgeonnement des granules de sécrétion à cœur dense **135**
Figure n°31 : Observation et analyse en TIRFM de l'exocytose des GSCD contenant la CgA-GFP ou le NPY-GFP au sein des cellules COS7 ou des cellules pancréatiques respectivement **137**
Figure n°32 : Représentation schématique du mode d'action potentiel du complexe CgA/PA lors de l'exocytose au sein des cellules neuroendocrines **138**
Figure n°33 : Les clusters de CgA situés à la membrane plasmique après exocytose régulée sont internalisés.....**141**
Figure n°34 : Structure des analogues de PA fluorescents commerciaux.....**143**
Figure n°35 : Localisation du PA-NBD au sein de différentes cellules **144**
Figure n°36 : Localisation du PA-TMR au sein de différentes cellules **145**
Figure n°37 : L'internalisation du PA-NBD n'est pas dépendante de la clathrine.....**146**
Figure n°38 : Protocole utilisé pour la formation des Giant Unilamellar Vesicles (GUVs) ..**157**
Figure n°39 : Étapes du couplage de la CgA avec l'Alexa 488 .....**158**
Figure n°40 : Protocole utilisé pour le suivi de l'externalisation de la CgA par immunocytochimie **166**
Figure n°41 : Protocole utilisé pour le dosage des catécholamines **169**

Avant-propos

Le système neuroendocrinien est constitué d'un réseau de cellules neuroendocrines dispersées dans le corps, qui sont particulières de par leur structure proche de celle des cellules nerveuses. Ces cellules perçoivent des signaux chimiques provenant du système nerveux central et y répondent en synthétisant des hormones et/ou des neuropeptides, au même titre que les cellules endocrines. Ces substances assurent de nombreuses fonctions physiologiques indispensables au fonctionnement de l'organisme. Les hormones et neuropeptides sont sécrétés dans la circulation sanguine par les cellules neuroendocrines *via* un mécanisme d'exocytose régulée des granules de sécrétion à cœur dense (GSCD), organites dédiés au stockage de ces hormones et neuropeptides. Pour aboutir à ce processus, les GSCD sont formés par bourgeonnement au niveau de la membrane de la face *trans* de l'appareil de Golgi, puis acheminés vers la membrane plasmique, avec laquelle ils fusionnent, libérant alors leur contenu dans le milieu extracellulaire. Cet événement d'exocytose régulée est rapidement suivi d'un mécanisme d'endocytose compensatrice qui permet de maintenir l'homéostasie cellulaire, en recapturant la portion membranaire correspondant à celle du GSCD ayant fusionné avec la membrane plasmique, recyclant ainsi les constituants membranaires du GSCD. La balance au niveau de ce cycle doit être parfaitement coordonnée et hautement régulée afin de maintenir le fonctionnement optimal de la cellule.

Malgré des avancées considérables dans la compréhension de ce processus de sécrétion au cours des 20 dernières années, les mécanismes moléculaires sous-jacents à certaines étapes restent à élucider. C'est notamment le cas des mécanismes permettant la formation des GSCD au niveau du complexe *trans*-golgien, ainsi que ceux à l'origine de la recapture d'hormones et de neuropeptides ainsi que, de leurs précurseurs et/ou de leurs métabolites, lors de l'endocytose compensatrice. En utilisant des modèles de cellules neuroendocrines (lignée de cellules PC12 dérivant d'un phéochromocytome de rat, lignée de cellules AtT20 dérivant d'une tumeur hypophysaire de souris, cellules chromaffines bovines en culture primaire), le groupe de recherche dirigé par le Pr. Maïté Montero s'intéresse depuis plusieurs années aux mécanismes régissant la biogenèse des GSCD au cours de l'exocytose régulée.

En septembre 2017, j'ai obtenu une bourse doctorale financée à 100 % par la région Normandie afin de participer à ces travaux, en étudiant les acteurs moléculaires ayant un rôle clé dans la sécrétion neuroendocrine, et plus particulièrement dans la déformation de la membrane du réseau *trans*-golgien à l'origine du bourgeonnement des GSCD. Lors de mon

arrivée, mon équipe d'accueil avait d'ores et déjà démontré que *(i)* la chromogranine A (CgA), protéine majoritaire des GSCD des cellules chromaffines, est impliquée dans la granulogénèse *via* ses extrémités N- et C-terminales, et que *(ii)* les protéines cytosoliques myosine 1b et l'actine filamenteuse sont nécessaires à la biogénèse des GSCD. Ayant réalisé les stages de Licence et Master au sein de l'équipe du Pr. Maïté Montero, j'ai pu participer à l'analyse de certaines expériences de l'article rapportant l'implication du complexe acto-myosine 1b, publié en 2017 dans *Scientific Reports*, et pour lequel je suis de ce fait co-auteure. Cet article se trouve en annexe de mon manuscrit.

Des travaux portant sur l'étude de l'interaction entre la CgA et l'acide phosphatidique (PA), un phospholipide présent au sein de la membrane golgienne, avaient étaient initiés lors de mon arrivée en doctorat. J'ai dès lors contribué à la finalisation de cette étude qui a donné lieu à un article publié en 2020 dans *The FASEB Journal*, pour lequel je signe en co-premier auteure. Cet article est présenté dans la partie « résultats » de mon manuscrit. Parallèlement, du fait de l'analyse de l'exocytose des GSCD contenant la CgA-GFP à l'aide de la microscopie à ondes évanescentes (TIRFM) et de l'observation d'une persistance de la fluorescence à la membrane plasmique après exocytose, nous nous sommes intéressés à la présence de la CgA au niveau des sites exocytiques à la membrane plasmique de cellules chromaffines bovines. Par ailleurs, nous avons étudié l'impact de l'inhibition de la synthèse du PA sur la sécrétion régulée de catécholamines et de CgA afin de déterminer si l'interaction CgA/PA au niveau des sites de fusion régule l'exocytose. Cet article en préparation est également présenté dans la partie « résultats » de mon manuscrit.

Mon manuscrit de thèse s'articule en cinq grands chapitres. Le premier chapitre est une introduction générale présentant la sécrétion neuroendocrine et la voie de sécrétion régulée, les mécanismes de tri et de formation des granules de sécrétion, le rôle central des lipides dans la régulation de la voie de sécrétion neuroendocrine, puis le couplage exocytose – endocytose au sein des cellules neuroendocrines. Le deuxième chapitre de mon manuscrit présentera les résultats obtenus au cours de ma formation doctorale. Le troisième chapitre est constitué d'une discussion autour des résultats obtenus durant ma thèse et le quatrième chapitre exposera les conclusions générales de mes travaux de thèse ainsi qu'une présentation des perspectives en résultant. Enfin, le cinquième et dernier chapitre clôturera mon manuscrit en présentant les techniques que j'ai principalement développées et utilisées pendant mon doctorat. En complément, vous trouverez plusieurs annexes, notamment une revue, un chapitre de livre et un article auxquels j'ai contribué et pour lesquels je suis co-auteure.

Je vous souhaite une agréable lecture.

INTRODUCTION

Partie I : Introduction

I. La sécrétion des cellules neuroendocrines

L'exocytose (du grec *exo* « hors de » et *kutos* « cellule ») des neurotransmetteurs ou des hormones, médiée par le calcium, joue un rôle primordial dans la biologie des organismes eucaryotes pluricellulaires. Les 2 phénomènes reposent sur le même principe : la fusion d'un organite cellulaire hautement spécialisé contenant les molécules informatives (vésicule synaptique (VS) pour les neurotransmetteurs ou GSCD pour les hormones) avec la membrane plasmique de la cellule, entraînant la libération de leur contenu dans la fente synaptique ou le flux sanguin, respectivement.

Il est désormais clair que, malgré la différence des types cellulaires impliqués, la neurotransmission et la sécrétion hormonale partagent de très nombreux acteurs moléculaires. On peut même aller plus loin, en remarquant que l'appareillage protéique assurant la sécrétion régulée des neurotransmetteurs et des hormones est souvent une adaptation, réussie et performante, de processus existants dans l'ensemble des cellules eucaryotes, qui sont d'ailleurs toutes dotées d'un pouvoir de sécrétion (sécrétion constitutive).

Au cœur des cellules sécrétrices, les protéines destinées à être secrétées sont synthétisées dans le cytosol et transloquées de manière co-traductionnelle dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER), à l'aide d'un peptide signal situé dans leur région N-terminale. Au sein de ce compartiment, elles subiront des modifications post-traductionnelles telles que la N-glycosylation ou la formation de ponts disulfures. Les protéines sont ensuite transportées par des vésicules recouvertes de la protéine COPII jusqu'au compartiment *cis*-golgien, puis vers la région médiane de l'appareil de Golgi pour enfin atteindre le réseau *trans*-Golgi (TGN). Lors de leur passage dans les différents saccules de l'appareil de Golgi, les protéines continuent leur maturation suite à de nouvelles modifications post-traductionnelles telles que la O-glycosylation ou l'amidation. Ces protéines sont ensuite triées et dirigées dans les vésicules des voies de sécrétion constitutive ou régulée. Les vésicules de la voie de sécrétion régulée sont formées par bourgeonnement à partir du TGN, alors que les vésicules de la voie de sécrétion constitutive, peuvent bourgeonner indifféremment de la région médiane de l'appareil de Golgi ou du TGN (Emr et al., 2009). Les vésicules ainsi formées seront alors prises en charge par les moteurs moléculaires associés aux microtubules, et transportées jusqu'à la périphérie cellulaire. Les vésicules de la voie de sécrétion constitutive fusionnent

alors avec la membrane plasmique, afin de renouveler les constituants membranaires et les composants de la matrice extracellulaire. En revanche, les vésicules de la voie de sécrétion régulée sont recrutées au cortex d'actine périphérique et fusionneront avec la membrane plasmique lorsque la cellule recevra un stimulus, induisant un influx calcique (Park and Loh, 2008) **(Figure n°1)**.

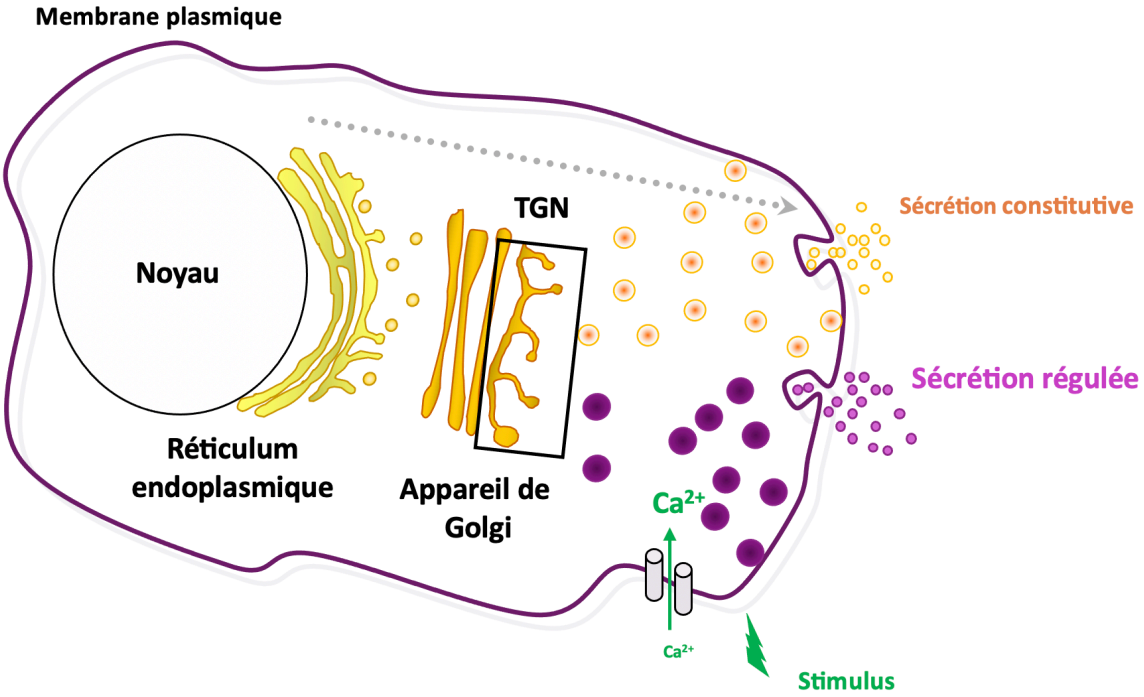


Figure n°1. Les voies de sécrétion de la cellule neuroendocrine. La voie de sécrétion constitutive, supportée par les vésicules constitutives, est un processus continu permettant le renouvellement de la matrice extracellulaire et de la membrane plasmique. La voie de sécrétion régulée est quant à elle supportée par les granules de sécrétion à cœur dense capables de fusionner avec la membrane plasmique et de libérer leur contenu (hormones, neuropeptides) dans le milieu extracellulaire suite à une stimulation cellulaire engendrant un influx calcique.

I.1 La sécrétion constitutive

La voie de sécrétion constitutive est commune à tous les types cellulaires. Elle a deux rôles clés dans le maintien de l'homéostasie cellulaire :

- Le renouvellement de la matrice extracellulaire (MEC) en libérant des protéines solubles (collagène, fibronectine, laminine, protéoglycanes et des protéases responsables du remaniement de la matrice) (Kelly, 1985)
- Le renouvellement de la membrane plasmique en apportant des lipides et des protéines membranaires (ex : récepteurs) afin de maintenir la croissance, la survie et la différenciation des cellules (Kelly, 1985; Stojilkovic, 2005; Tartakoff et al., 1978).

Le contenu des vésicules de la voie de sécrétion constitutive n'est pas condensé, comme l'atteste leur aspect clair en microscopie électronique, d'où leur appellation de « vésicules à

cœur clair ». Elles sont de petite taille : de 80 à 100 nm de diamètre, et leur pH est proche de la neutralité. Ces vésicules fusionnent avec la membrane plasmique de manière continue, ce qui entraîne la sécrétion directe des substances dès lors que les cellules les ont synthétisées et adressées dans ces vésicules. La vitesse de leur sécrétion dépend donc de la vitesse à laquelle elles sont produites, leur transport depuis l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane plasmique durant en moyenne 10 minutes (Gondré-Lewis et al., 2012).

I.2 La sécrétion régulée

La sécrétion régulée est un mécanisme primordial à la base de toute communication intercellulaire au sein d'un organisme pluricellulaire. Elle consiste en une libération contrôlée par des cellules sécrétrices, telles que les cellules endocrines et neuronales, de substances chimiques messagères à destination de cellules cibles. Afin que ces substances puissent exercer leurs fonctions physiologiques hors de la cellule sécrétrice, elles sont adressées et stockées dans les GSCD, organistes spécialisés et délimités par une membrane. En réponse à un signal physiologique, ces GSCD, transportés *via* les microtubules jusqu'à la périphérie cellulaire, fusionnent avec la membrane plasmique, libérant ainsi leur contenu à l'extérieur de la cellule. Ce mécanisme cellulaire finement contrôlé est la clé de la régulation de la sécrétion hormonale.

Les GSCD sont nommés ainsi de par leur aspect dense en microscopie électronique. La densité des GSCD est due à l'importante concentration en protéines solubles, telles que les hormones et les granines, protéines possédant une forte capacité d'agrégation, dans des conditions de pH acide et de forte concentration calcique présentes dans l'appareil de Golgi (AG) et dans les GSCD, avec les protéines et les peptides destinés à la voie de sécrétion régulée (Malosio et al., 2004; Meldolesi et al., 2004).

La taille des GSCD varie entre 60 et 300 nm, selon les types cellulaires (cellules neuronales ou endocrines). Par ailleurs, la formation des GSCD au sein de ces différents types cellulaires nécessite des étapes communes telles que le bourgeonnement à partir de la membrane du TGN, suivi d'une étape de maturation permettant aux GSCD de devenir fonctionnels (Kim et al., 2006). Lors de leur transit au sein du RER puis dans l'AG, les protéines destinées à la voie de sécrétion régulée subissent des modifications post-traductionnelles telles que la formation de ponts disulfures, la glycosylation, la sulfatation, l'amidation et la phosphorylation (Chrétien and Mbikay, 2016; Gondré-Lewis et al., 2012). Au niveau du TGN, les protéines de la voie de sécrétion régulée sont sélectionnées puisqu'elles ont la capacité de s'agréger dans des conditions de pH acide et de forte concentration calcique, puis sont dirigées vers la membrane du TGN et adressées aux GSCD lors de leur bourgeonnement.

Contrairement à la transmission synaptique chimique des cellules neuronales qui a lieu sur des échelles spatiale et temporelle très réduites (quelques centaines de nanomètres entre les deux neurones et un délai de quelques millisecondes), la sécrétion hormonale des cellules endocrines met en jeu des distances entre cellules émettrices et réceptrices pouvant atteindre plusieurs mètres et des délais d'action variant de la seconde à plusieurs jours. Malgré ces différences, la libération de neurotransmetteurs et la sécrétion hormonale sont basés sur des mécanismes moléculaires similaires. Ces mécanismes moléculaires concernent également la sécrétion régulée des cellules neuroendocrines qui ont la particularité d'héberger des vésicules synaptiques et des GSCD.

I.3 Mécanismes moléculaires de la sécrétion régulée

Afin de pouvoir libérer leur contenu par exocytose dans le milieu extracellulaire, les GSCD sont transportés depuis le TGN jusqu'à la périphérie de la cellule. Ces processus de transport et de rétention des GSCD en périphérie font intervenir respectivement le réseau de microtubules (Neco et al., 2003) et de filaments d'actine (Rudolf et al., 2001), ce dernier étant particulièrement dense en périphérie de la cellule (Nakata and Hirokawa, 1992).
Afin de fusionner avec la membrane plasmique, les GSCD vont subir différentes étapes correspondant à : **l'accostage, l'arrimage, l'amorçage** puis **la fusion** de la membrane du GSCD avec la membrane plasmique **(Figure n°2).** Ces différentes étapes sont finement régulées par l'influx de calcium consécutif à la stimulation de la cellule.

Au repos, c'est-à-dire lorsque les cellules neuroendocrines ne sont pas stimulées, les GSCD sont recrutés dans le réseau cortical de filaments d'actine. A ce stade, RhoA, une protéine G à activité GTPasique, activée par la protéine Go, toutes deux localisées au niveau de la membrane des GSCD, empêche le recrutement des GSCD à la membrane plasmique (Takai et al., 2001). En effet, une fois activée, RhoA active à son tour la phosphatidylinositol 4-kinase (PI 4-kinase), une enzyme produisant le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) au niveau de la membrane des GSCD (Gasman et al., 1998). Le PIP2 formé est décrit dans la littérature comme initiant la nucléation de l'actine et régulant les interactions membrane-cytosquelette (Raucher et al., 2000). La formation de PIP2 granulaire stabilise alors la barrière d'actine périphérique. Ainsi, la régulation de la voie RhoA/PI 4-kinase et la formation de PIP2 est cruciale dans la réorganisation de l'actine précédent l'exocytose (Bader et al., 2004). Lorsque les cellules neuroendocrines sont stimulées, ce réseau cortical d'actine est inversement contrôlé afin de permettre aux GSCD d'accéder à la membrane plasmique. La scindérine, protéine activée suite à l'influx de calcium, a la capacité de couper le cortex d'actine

en fragments, entraînant la libération des GSCD des filaments d'actine (Trifaró et al., 2000), et permettant ainsi l'accostage des GSCD.

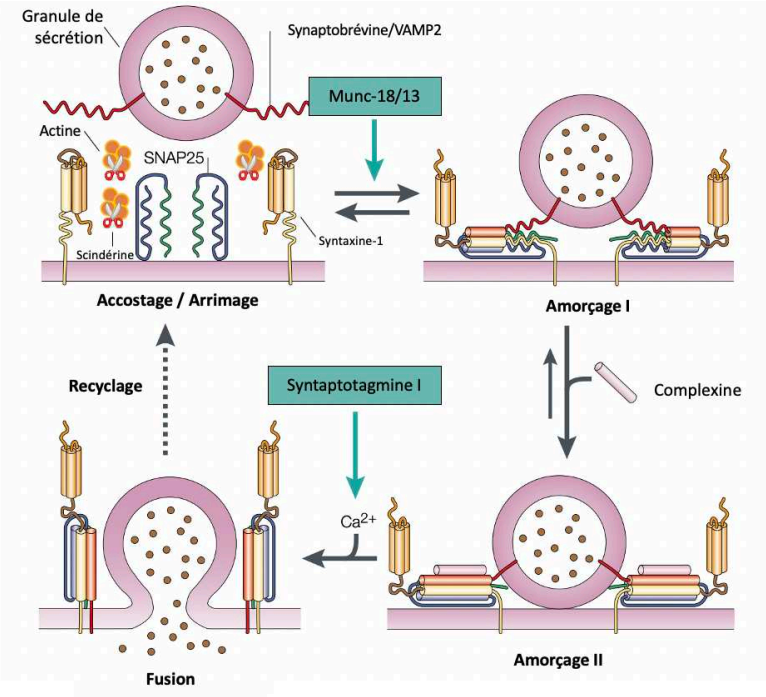


Figure n°2. Schéma simplifié des différentes étapes de l'exocytose. Lors de l'accostage, le réseau cortical d'actine est coupé en petits fragments (billes orange) par la scindérine (ciseaux), protéine activée suite à l'influx de calcium, permettant ainsi la libération des granules de sécrétion. Les protéines SNAREs interviennent également préliminairement dans cette étape en permettant la reconnaissance entre la membrane du granule de sécrétion et la membrane plasmique. Lors de l'arrimage, un complexe va se former entre les protéines R-SNARE de la membrane du granule de sécrétion (synaptobrévine, VAMP2) et les Q-SNARE de la membrane plasmique (SNAP-25 et syntaxine-1). Lors de l'amorçage, le granule de sécrétion devient compétent pour la fusion. Munc-18 et Munc-13 jouent un rôle important lors de cette étape en régulant l'assemblage du complexe SNARE. Lors d'une stimulation, la synaptotagmine I, présentant un domaine d'interaction au calcium, est capable de déplacer la complexine, rendant l'amorçage du granule de sécrétion possible. Finalement, la fusion a lieu suite à une augmentation des concentrations intracellulaires de calcium, permise par une stimulation de la cellule. Adapté de Rizo et Südhof, 2002.

L'accrochage du GSCD à la membrane plasmique est décomposé en 2 étapes successives : « tethering » et « docking » (Südhof, 1995, 2004), traduites en français sous les termes « accostage » et « arrimage » respectivement. L'accostage correspond à l'établissement du premier contact physique entre les protéines à la membrane du GSCD et celles à la membrane plasmique. Ce contact entre les 2 compartiments est lâche et nécessite la formation d'un lien plus fort, en amont de la fusion : c'est l'arrimage. Ces 2 étapes impliquent donc des acteurs de nature différente.

En ce qui concerne l'accostage, et donc l'adressage du GSCD au niveau de la membrane plasmique, il est décrit que les petites GTPases de la famille Rab jouent un rôle primordial dans cette étape (Zerial and McBride, 2001). Ce rôle est en autre tenu par Rab3A

et Rab27A, présentes au niveau de la membrane des GSCD, et qui, une fois liées au GTP, semblent réguler le recrutement d'effecteurs pour permettre la liaison du GSCD à la membrane plasmique (Desnos et al., 2003). La protéine Rab3A, est capable de lier, entre autres, la protéine RIM (Rab3 Interacting Molecule) retrouvée au niveau de la membrane plasmique ou des protéines du complexe SNARE, acteurs clé de l'exocytose (Johannes et al., 1996; Wang et al., 1997). La protéine Rab27A, quant à elle, est capable de lier le cytosquelette d'actine (Huet et al., 2012).

Ces effecteurs, recrutés par les protéines Rab, sont la plupart du temps des complexes protéiques de grande taille. Le plus caractérisé des complexes protéiques est le complexe exocyste, ou complexe Sec6/8, formé de huit sous-unités : Sec3/5/6/8/10/15/exo70/Exo84, réparties entre le site de fusion et la membrane des GSCD. Il joue un rôle clé dans la sécrétion chez la levure et possède un équivalent chez les mammifères (Hsu et al., 1999, 2004). Ce complexe permettrait aux GSCD d'être recrutés et positionnés de façon adéquate à la membrane plasmique en se liant avec des protéines du GSCD et de la membrane plasmique. Il est important de noter que ces protéines peuvent également interagir avec le complexe SNARE ou avec les petites GTPases (Heider and Munson, 2012).

L'étape suivante, l'arrimage, provenant du mot anglais « docking » selon le consortium scientifique, est définie suite à l'observation en microscopie électronique de vésicules accolées à la membrane plasmique. Les protéines SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) sont impliqués dans la reconnaissance de la membrane cible par le GSCD, grâce aux interactions entre des Q-SNARE et des R-SNARE. La fusion entre deux portions membranaires particulières serait la résultante de l'assemblage d'un complexe formé de protéines SNARE spécifiques (Jahn et al., 2003), et il est important de noter qu'une R-SNARE donnée est capable de s'apparier avec différents types de Q-SNARE (Brandhorst et al., 2006; Fasshauer et al., 1999). Par ailleurs, dans des cellules chromaffines de souris n'exprimant pas la SNAP-25, l'étude des cinétiques de sécrétion a montré que l'absence de cette protéine pouvait être partiellement compensée par l'expression d'un de ses homologues, la SNAP-23 (Sørensen et al., 2003).

Ce complexe SNARE, pour pouvoir se mettre en place, nécessite des protéines situées à la fois au niveau des membranes des GSCD (synaptobrévine/VAMP, R-SNARE) et également des protéines situées au niveau de la membrane plasmique (SNAP-25/syntaxine, Q-SNARE). Cependant, des exceptions existent. SNAP-25 peut être présente au niveau de la membrane granulaire et VAMP2 à la membrane plasmique par exemple (Tagaya et al., 1995, 1996; Umbrecht-Jenck et al., 2010). Lorsque les Q-SNARE et les R-SNARE complémentaires interagissent, leurs domaines α hélicoïdaux s'enroulent entre eux pour former un complexe

stable, et permettre le rapprochement de la membrane des GSCD de la membrane plasmique. Ainsi, le complexe *trans*-SNARE qui en résulte verrouille les deux membranes ensemble, et par un mécanisme de « fermeture éclair », la fusion membranaire des deux compartiments a lieu. Le complexe *trans*-SNARE devient alors le complexe *cis*-SNARE (Burgoyne and Morgan, 2003) **(Figure n°3).** Au sein des cellules neuroendocrines, ce sont les isoformes syntaxine-1, SNAP-25 et VAMP2 qui sont impliquées dans la formation de ce complexe (Söllner et al., 1993). Certaines protéines ont un rôle clé dans la régulation de cette étape d'arrimage, telle que la complexine qui est capable de se lier au complexe SNARE en formation, empêchant alors son association et la fusion des GSCD avec la membrane plasmique (Giraudo et al., 2006).

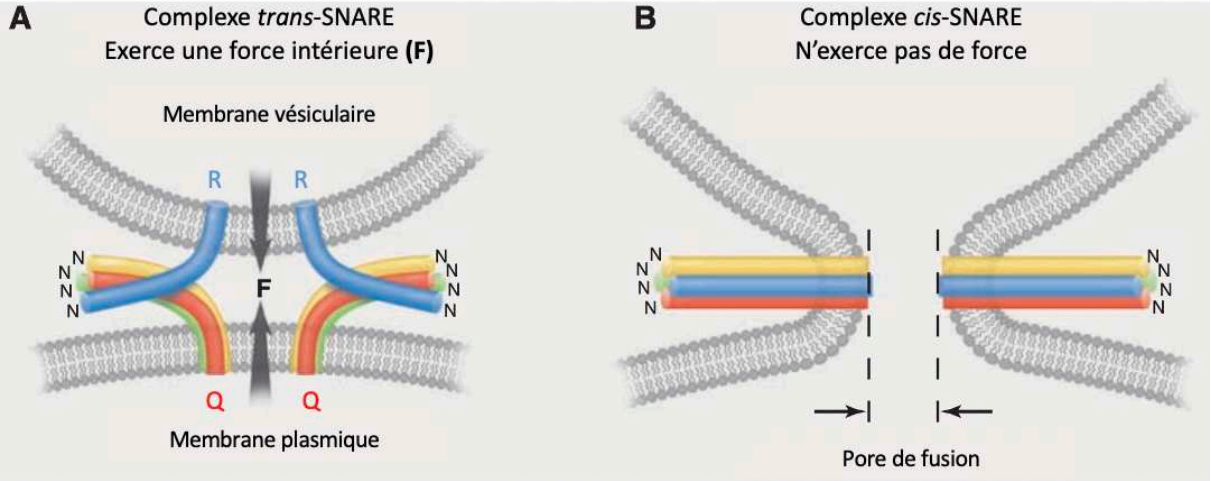


Figure n°3. Représentation schématique du modèle de fermeture éclair dirigé par les SNAREs permettant la mise en place de l'étape d'arrimage puis conduisant à la fusion des compartiments. *(A)* Les trois hélices ancrées au niveau de la membrane plasmique (Q-SNARE) s'assemblent avec la quatrième hélice ancrée au niveau de la membrane du GSCD (R-SNARE) pour former un complexe *trans*-SNARE. L'assemblage se déroule progressivement à partir des extrémités N-terminales (N) vers les extrémités C-terminales des SNARE. Cela génère un vecteur de force vers l'intérieur (F) qui rassemble les bicouches, les forçant à fusionner. *(B)* Par conséquent, lorsque la fusion a eu lieu, la force disparaît et les SNARE sont sous forme de complexe *cis*-SNARE à faible énergie. Adapté de Südhof et Rothman, 2009.

L'amorçage de la fusion du GSCD avec la membrane plasmique regroupe l'ensemble des processus (réarrangements moléculaires, modifications protéines et lipidiques) rendant les GSCD compétents pour la fusion (Klenchin and Martin, 2000). Cette étape de l'exocytose fait intervenir une douzaine de protéines, dont beaucoup sont essentielles. Parmi elles, Munc13-1 et Munc18-1 sont des facteurs régulant l'amorçage grâce à leur interaction avec syntaxine-1 et modifiant ainsi sa conformation (Baker and Hughson, 2016; Rizo and Xu, 2015; Sugita, 2008). En effet, au repos, Munc18-1 lie la syntaxine-1 lorsque celle-ci n'interagit pas avec ses partenaires (SNAP-25 et VAMP2) (Dulubova et al., 1999; Toonen et al., 2006; Voets et al., 2001). Puis, lorsque le GSCD s'arrime à la membrane, Munc13-1, interagit à son tour

avec la syntaxine-1 et va déplacer la protéine Munc18-1. Les deux protéines sont donc en compétition et interagissent tour à tour avec la syntaxine-1 (Betz et al., 1997). La liaison de Munc13-1 avec la syntaxine-1 induit un changement de conformation, permettant l'assemblage du complexe SNARE (Ma et al., 2011; Sassa et al., 1999). Munc18-1 pourrait alors stabiliser le complexe SNARE et empêcher sa dissociation puisque Munc18-1 est également capable d'interagir avec la forme "active" de la syntaxine-1 au sein du complexe SNARE ainsi qu'avec la SNAP-25 (Dulubova et al., 2007; Hata et al., 1993; Rizo and Südhof, 2012; Toonen et al., 2005).

Par ailleurs, la définition électrophysiologique de l'amorçage correspond à une élévation suffisante des concentrations intracellulaires de calcium pour déclencher la fusion des GSCD avec la membrane plasmique. Ainsi, au niveau du site d'exocytose, des protéines ayant un rôle de senseurs calciques doivent être présentes. Parmi ces protéines, la synaptotagmine I appartient à une famille de protéines contenant 2 domaines C2, capables de lier fortement le calcium et les lipides membranaires. La synaptotagmine I, grâce à son étroite coopération avec la complexine est capable d'inhiber la fusion, lorsque les concentrations en calcium sont faibles (au repos). Mais lors d'une stimulation, entrainant une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium, la synaptotagmine I est capable de déplacer la complexine, permettant ainsi l'amorçage du GSCD à la membrane plasmique (Chapman, 2008; Diao et al., 2012; Giraudo et al., 2006).

La première étape du processus de fusion est la formation d'un pore de fusion. Un débat réside toujours au sein de la communauté scientifique quant à la nature de ce pore, purement lipidique ou protéo-lipidique **(Figure n°4).**

D'après le modèle courant, lipidique, le rapprochement des bicouches lipidiques entraînerait la formation d'un contact étroit entre les monocouches tournées vers le cytoplasme (monocouches proximales). L'extension de ce contact étroit permet la création d'un stade « d'hémifusion » dans lequel les monocouches proximales sont en continuité mais les monocouches distales restent disjointes. Par la suite, le milieu intracellulaire et extracellulaire entreront en communication lorsque le pore de fusion s'ouvrira à travers les monocouches distales (Brunger, 2000).

Le modèle de formation du pore de nature protéo-lipidique, a quant à lui été décrit chez la levure, en observant la fusion vacuolaire (Peters et al., 2001). Dans ce modèle, le pore de fusion est constitué par l'accolement en *trans* de deux segments membranaires V0 de l'ATPase vacuolaire (Mayer, 2002). De plus, les données obtenues en étudiant la fusion homotypique des vacuoles de levure *in vitro* suggèrent que les SNARE rapprochent les membranes jusqu'à la formation d'un complexe de secteurs V0 en *trans* ; ces secteurs

accolent les membranes, ouvrent un pore de communication entre les deux compartiments permettant la communication des contenus (Peters et al., 2001). Cette hypothèse de pore protéo-lipidique reste encore très controversée en ce qui concerne les cellules mammaliennes.

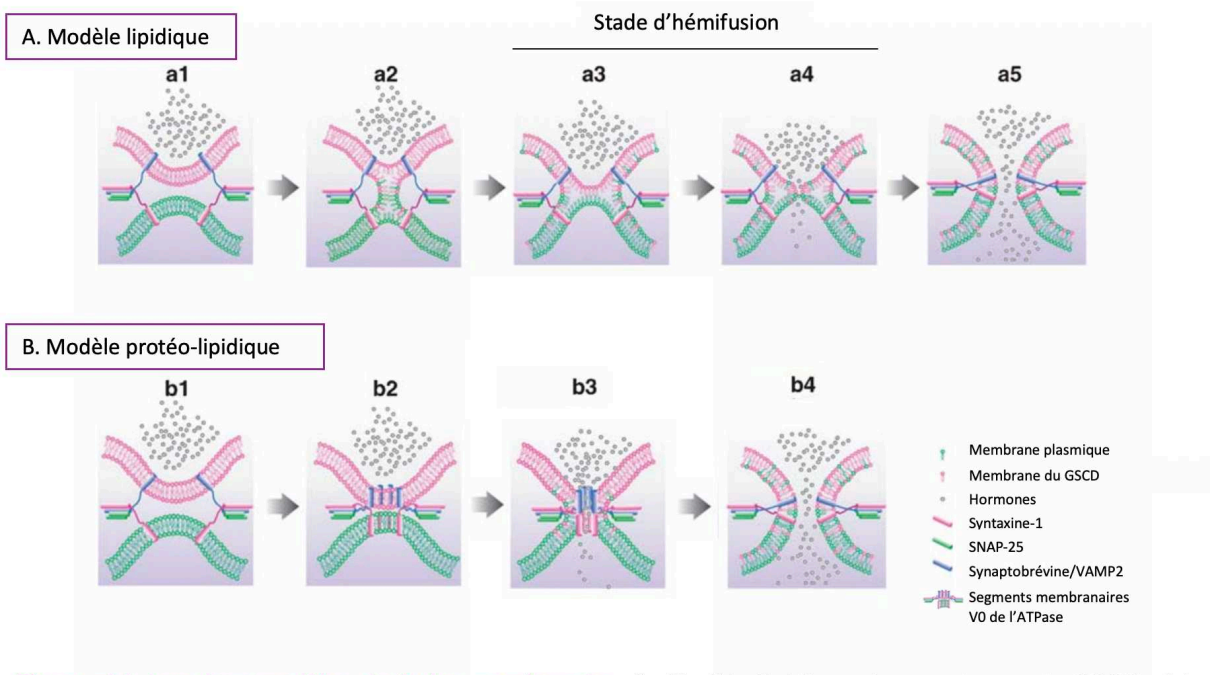


Figure n°4. Les deux modèles de fusion membranaire. **A. Modèle lipidique.** La membrane du GSCD et la membrane plasmique se rapprochent grâce aux forces exercées par les protéines SNAREs *(a1).* Ensuite, on a l'initiation de l'hémifusion entre les deux membranes par la formation d'un contact étroit *(a2).* La monocouche proximale s'écarte et la monocouche distale forme une nouvelle bicouche, la membrane d'hémifusion *(a3 et a4).* Puis, le pore de fusion lipidique est formé *(a5).*
B. Modèle protéo-lipidique. Les segments membranaires V0 de l'ATPase sont localisés au niveau de la membrane granulaire et de la membrane plasmique *(b1).* Ils vont s'associer pour former un pore en configuration fermée (*b2).* Puis, la dissociation des sous-unités des segments V0 permet l'invasion du pore par les phospholipides *(b3)* et son ouverture *(b4).* Adapté de Jackson et Chapman, 2008.

Quelle que soit la nature du pore de fusion, son ouverture conduit à deux possibilités : soit le pore s'étend, permettant la libération de la totalité du contenu du GSCD dans le milieu extracellulaire et la membrane du GSCD fusionne alors complètement avec la membrane plasmique = *full fusion* ; soit l'ouverture du pore n'est que transitoire et de courte durée (<1 s) et le pore se referme après que le GSCD ait libéré une partie de son contenu, en l'occurrence les molécules de petite taille, comme les catécholamines (Harata et al., 2006) = *kiss-and-run* **(Figure n°5).** C'est la quantité de calcium pénétrant dans la cellule suite au type de stimulation qui va induire le mode de fusion (Elhamdani et al., 2006). Dans le premier cas, le recyclage du GSCD se produit lors d'un processus séparé appelé endocytose compensatrice (Houy et al., 2013), qui est en quelque sorte le processus inverse de l'exocytose. L'endocytose met généralement en jeu des protéines cytosoliques spécifiques, telles que la clathrine et la dynamine, et impose un passage par les endosomes puis par le TGN (Houy et al., 2013). Dans le second cas, le recyclage peut être plus rapide : le GSCD, dont la membrane est quasi

intacte, peut repartir et revenir ultérieurement à la membrane plasmique, sans repasser par le TGN, d'où l'appellation de *kiss-and-run* pour cette seconde option (Elhamdani et al., 2006).

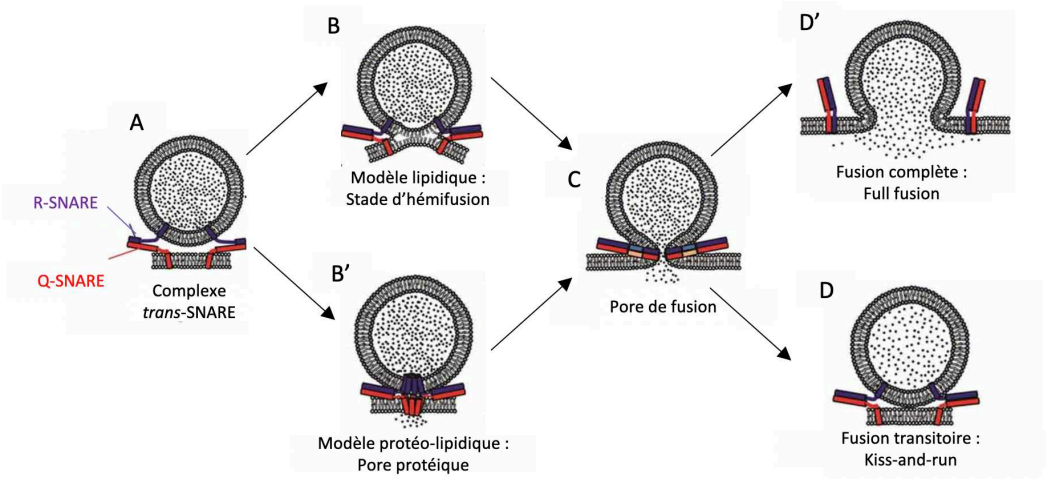


Figure n°5. Schéma récapitulant les différentes alternatives permettant la fusion d'un GSCD avec la membrane plasmique. *(A)* Le GSCD est amorcé à la membrane plasmique grâce au complexe *trans* formé par les R-SNAREs situées au niveau de la membrane du GSCD et les Q-SNAREs situées au niveau de la membrane plasmique. S'en suit l'initiation de la formation du pore de fusion selon l'hypothèse lipidique *(B)* et/ou protéo-lipidique *(B')*. *(C)* Ensuite, le complexe *cis* formé par les SNAREs permet la formation et l'ouverture du pore de fusion. L'expansion du pore de fusion permet la libération du contenu du GSCD. *(D)* Soit la libération est limitée par une refermeture rapide du pore de fusion *(kiss-and-run). (D')* Soit le contenu du GSCD est complètement libéré dans le milieu extracellulaire *(full fusion).* Adapté de Wu et al., 2017.

II. La voie de sécrétion régulée des cellules neuroendocrines

II.1 Agrégation et tri des protéines au niveau du réseau *trans*-golgien

La formation des GSCD est initiée par bourgeonnement de la membrane du TGN. Ce mécanisme nécessite l'intervention de protéines et lipides membranaires, ainsi que de protéines solubles et cytosoliques (Kim et al., 2006). Ainsi, dans cette section, seront discutés les différents mécanismes proposés afin de permettre l'adressage des précurseurs hormonaux au sein de la voie de la sécrétion régulée des cellules neuroendocrines.
Dans la littérature, deux modèles ont été proposés quant aux mécanismes de tri des protéines au niveau du TGN : **Sorting-for-entry** et **Sorting-by-retention** (Blázquez and Shennan, 2000; Dikeakos and Reudelhuber, 2007) **(Figure n°6).**

La première hypothèse, correspondant à un mécanisme actif, est divisée en plusieurs étapes. Le mécanisme initial implique l'agrégation des protéines destinées à la voie de sécrétion régulée (précurseurs d'hormonaux), dans un environnement acide à pH 6 – 6,5, et à forte concentration calcique. Cette agrégation permet l'exclusion des protéines destinées à

la voie de sécrétion constitutive (Bauerfeind and Huttner, 1993; Canaff et al., 1996; Chanat and Huttner, 1991; Gerdes et al., 1989). Plusieurs études ont rapporté que les agrégats ainsi formés interagissent avec la membrane du TGN, *via* un récepteur d'adressage. Ainsi, la forme membranaire de la carboxypeptidase E (CPE) est impliquée dans l'adressage de la pro-opiomélanocortine (POMC) (Cool et al., 1997) et du pro-*Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) (Lou et al., 2005) dans la voie de sécrétion régulée des cellules corticotropes hypophysaires et des neurones hippocampaux, respectivement. Par ailleurs, il a également été montré que la sécrétogranine III (SgIII), une protéine associée aux microdomaines membranaires enrichis en cholestérol et en sphingolipides au niveau du TGN, joue un rôle de récepteur d'adressage pour la chromogranine A (CgA) (Hosaka et al., 2002).

Plus récemment, un affinement du mécanisme de « sorting-for-entry » a été proposé. En effet, il semblerait que plusieurs enzymes de maturation soient adressées à la voie de sécrétion régulée grâce à l'interaction de leurs domaines C-terminaux avec les domaines lipidiques présents à la membrane du TGN. C'est le cas, par exemple de la peptidylglycine α-amidating monooxygenase (PAM) (Milgram et al., 1996; Park and Loh, 2008), de la CPE et des prohormones convertases (PC) 1/3 et 2 (Assadi et al., 2004; Dhanvantari and Loh, 2000; Dhanvantari et al., 2002; Zhang et al., 2003).

La seconde hypothèse, correspondant quant à elle à un mécanisme passif, fut la première proposée par Arvan et Castle (Arvan and Castle, 1998) pour l'adressage de la pro-insuline au sein des cellules β-pancréatiques. Ils ont observé que, hormis la pro-insuline, d'autres protéines telles que des enzymes lysosomales sont présentes au sein des GSCD immatures, puis sont éliminées ensuite par bourgeonnement de vésicules constitutive-like alors que l'insuline est toujours présente dans les GSCD en maturation (Arvan and Castle, 1998). Une autre étude a quant à elle suggéré que la CPE peut servir de « récepteur de rétention » dans les GSCD immatures (GSI), permettant ainsi la retenue de l'insuline au sein des GSCD des cellules β-pancréatiques (Dhanvantari et al., 2003).

De façon générale, les protéines destinées à la voie de sécrétion constitutive entrent dans les vésicules constitutives par défaut (Halban and Irminger, 1994; Hummer et al., 2020). Pourtant, certaines de ces protéines, telle que la furine, une enzyme transmembranaire, sont agrégées avec les protéines destinées à la voie de sécrétion régulée au sein des GSI (Dannies, 1999; Kuliawat et al., 1997). Par la suite, lors de la maturation des GSI, l'élimination de la furine sera permise grâce à la phosphorylation de sa partie cytoplasmique par la caséine kinase-2 (Dittié et al., 1997), puis par sa liaison à la AP-1 (protéine adaptatrice 1) et à PACS-1 (Phosphofurin acidic cluster sorting protein 1) de manière ARF1 (ADP-ribosylation, factor 1) dépendante. Cette liaison entraînera le manteau de clathrine puis le bourgeonnement des vésicules constitutive-like contenant la furine (ces vésicules constitutive-like peuvent être

recyclées au TGN *via* les endosomes ou sécrétées de manière constitutive) (Crump et al., 2001).

Au regard des dernières études sur les mécanismes impliqués, il semblerait que les 2 mécanismes soient nécessaires pour un adressage optimal des protéines vers la voie de sécrétion régulée. Par conséquent, il semblerait que les protéines de la voie de sécrétion régulée soient séparées des protéines de la voie de sécrétion constitutive au niveau du TGN par agrégation, suivie d'une association membranaire de l'agrégat soit directement avec les lipides (Dikeakos and Reudelhuber, 2007) soit *via* des récepteurs d'adressage des protéines. Une étape de tri secondaire par bourgeonnement des vésicules constitutive-like lors de la maturation des GSCD impliquerait l'élimination des protéines entrées dans les GSI, et qui ne sont pas destinées à être sécrétées de manière régulée.

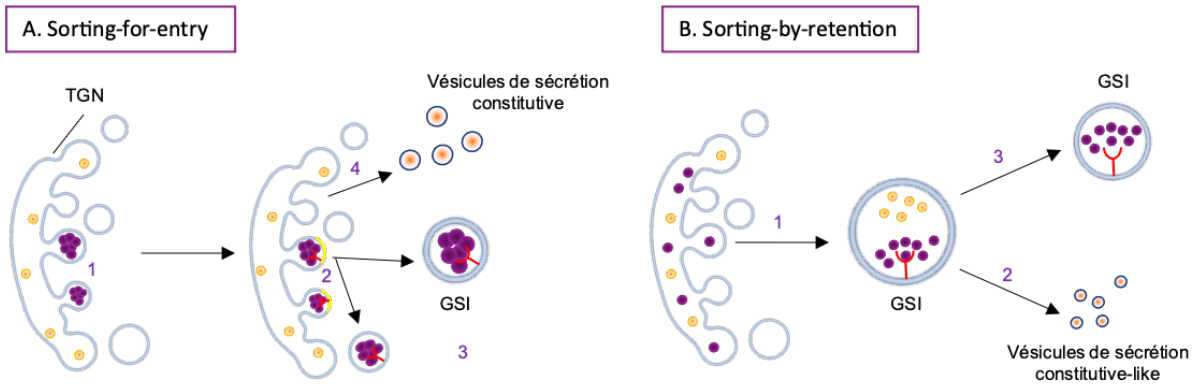


Figure n°6. Hypothèses relatant le tri des protéines destinées à la voie de sécrétion régulée.
A. Sorting-for-entry. *(1)* Les protéines destinées à la voie de sécrétion régulée sont agrégées au niveau du TGN sous conditions de pH acide (6-6,5) et de forte concentration calcique. *(2)* Ces protéines sont ensuite triées en interagissant avec les rafts lipidiques présents au niveau de la membrane du TGN au niveau desquels se trouvent des récepteurs d'adressage. *(3)* Formation des GSCD immatures (GSI). *(4)* Les autres protéines présentes au niveau du TGN sont quant à elles destinées à la voie de sécrétion constitutive.
B. Sorting-by-retention. *(1)* Toutes les protéines destinées à être sécrétées sont agrégées et adressées vers les GSI. *(2)* Les protéines non destinées a être sécrétées de manière régulée vont être recyclées *via* les vésicules de sécrétion constitutive-like. *(3)* Les protéines devant emprunter la voie de sécrétion régulée restent dans les GSI (*via* une interaction avec des récepteurs de rétention) qui deviendront par la suite matures. Adapté de Tooze, 1998 et de Park et Loh, 2008.

II.2 Transport et maturation des granules de sécrétion

II.2.1 Transport

Les GSI formés à partir du TGN ne sont pas fonctionnels et vont subir des modifications afin d'assurer la libération de leur contenu dans le milieu extracellulaire. L'étude de ces GSI est relativement compliquée, puisque les cellules sécrétrices contiennent des milliers de GSCD matures (GSM) avec un temps de demi – vie de plusieurs jours alors que les GSI

représentent un petit pourcentage de la population de GSCD totale, avec un temps de demi – vie court, de l'ordre de 45 minutes dans les cellules neuroendocrines (Tooze et al., 1991). Ces contraintes supposent donc la nécessité d'un marquage spécifique des GSI pour suivre leur devenir, comme par exemple, des expériences de pulse/chase en surexprimant une protéine de la voie de sécrétion régulée fusionnée avec un mutant de la GFP sensible à la température (S65T) dans des cellules PC12 (Kaether et al., 1997; Rudolf et al., 2001). Ce protocole permet de générer des GSI qui peuvent être suivis jusqu'à la périphérie cellulaire, afin d'élucider le devenir des GSI. Ces expériences ont permis de montrer qu'après leur biogénèse au niveau du TGN, les GSI rejoignent *via* les microtubules le cortex de F-actine périphérique en quelques minutes (Rudolf et al., 2001). Ce transport unidirectionnel indique une absence de l'activité de la dynéine sur les GSI dirigés vers la périphérie cellulaire (Rudolf et al., 2001).

Dans des cellules dérivant d'insulinome, le transport des GSI est rapide et bidirectionnel suite à une stimulation par le glucose. Il a été montré que l'inhibition *via* des siRNA de la kinésine 1 entraîne une inhibition complète du transport des GSI et que l'inhibition de la dynéine engendre une inhibition partielle du transport (Varadi et al., 2003), suggérant que dans ce type cellulaire, la kinésine 1 et la dynéine sont impliquées dans le transport des GSI vers la périphérie.

Dans des cellules AtT20, il a été montré que les GSI interagissent *via* la CPE et la dynactine avec la kinésine 2 et la kinésine 3, mais pas avec la kinésine 1 (Park et al., 2008). Ainsi, les acteurs moléculaires responsables du transport des GSI le long des microtubules vers le cortex cellulaire sont spécifiques du type cellulaire considéré.

Lorsque les GSI arrivent à la périphérie cellulaire, ils entrent en contact avec le réseau cortical de F-actine, où leur maturation va s'achever avant de pouvoir libérer leur contenu dans le milieu extracellulaire (Desnos et al., 2007; Rosé et al., 2003; Rudolf et al., 2001).

II.2.2 Maturation

La maturation des GSI est un processus hautement régulé, composé de plusieurs étapes distinctes et se réalisant en quelques heures **(Figure n°7).**

II.2.2.1 Fusion homotypique

En étudiant les cellules mammotropes de l'antéhypophyse de rate en lactation, l'équipe de Farquahr en 1966, a proposé l'idée que les GSI subissent une fusion homotypique. Cette proposition résulte principalement de l'observation de petits granules dérivés du Golgi (100 à 200 nm) qui, en s'agrégeant forment des GSI polymorphes qui finissent par s'arrondir pour devenir des GSM (600 à 900 nm) (Smith and Farquhar, 1966). Plus tard, cette proposition a été validée par d'autres équipes (Tooze and Huttner, 1990; Urbé et al., 1998). Ces études ont

également permis l'identification de molécules fonctionnellement impliquées dans la fusion GSI – GSI. En plus du NSF (N-ethylmaleimide sensitive factor) (Urbé et al., 1998) et de l'α-SNAP (Wendler et al., 2001), les protéines SNARE, la syntaxine 6 (Wendler et al., 2001) et la synaptotagmine IV (Ahras et al., 2006), ont été montrées comme étant impliquées dans ces phénomènes de fusion membranaire entre GSI. Il est important de noter que les molécules impliquées sont différentes de celles permettant la fusion entre les GSM et la membrane plasmique (à savoir, la syntaxine 1 et SNAP 25).

Par ailleurs, dans plusieurs types cellulaires endocriniens, des événements de fusion homotypique ont également été décrits pour les GSM, lors d'une stimulation cellulaire. Dans ce cas, la fusion homotypique des GSM précède leur fusion avec la membrane plasmique, entrainant la libération d'une grande quantité de molécules cargos. Par conséquent, ce phénomène a été appelé exocytose quantique (Cochilla et al., 2000; Orci and Malaisse, 1980; Tooze et al., 1991).

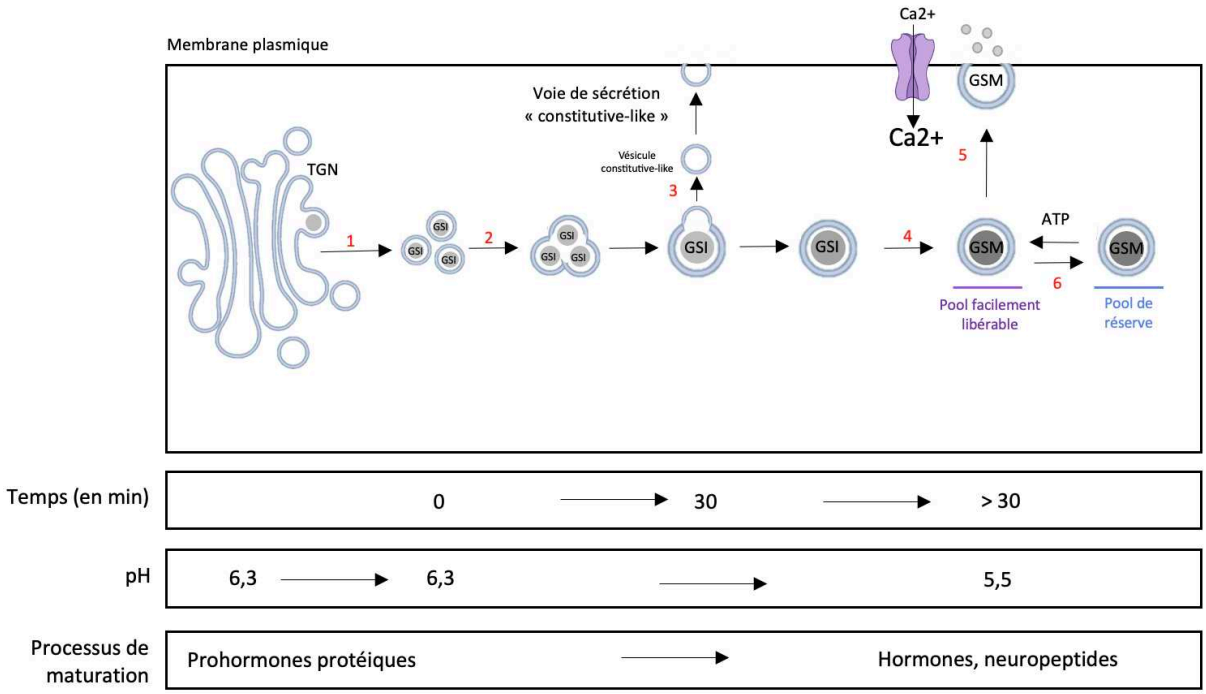


Figure n°7. Schéma récapitulant les étapes de maturation des GSCD. *(1)* Au niveau du TGN, les protéines destinées à être sécrétées de manière régulée sont triées et adressées aux GSI naissants (sorting-at-entry). *(2)* Les GSI subissent une fusion homotypique. *(3)* Les protéines non destinées à être sécrétées de façon régulée sont éliminées en étant empaquetées dans un excès de membrane formant ainsi les vésicules constitutive-like (sorting-by-retention). *(4)* Les GSI sont convertis en GS matures (GSM) impliquant une acidification, une condensation supplémentaire de la lumière du GSM (schématisée par l'assombrissement du gris du cœur) et la maturation des précurseurs protéiques. *(5)* Les GSM relarguent alors leur contenu dans le milieu extracellulaire de manière régulée (dépendante du calcium). Une petite fraction des GSM forme le pool facilement libérable. *(6)* La majeure partie des GSM est stockée sous forme de réserve et le confinement au pool de réserve est réversible.
Les panneaux inférieurs renseignent sur la durée du processus de maturation, l'évolution du pH de la lumière des GSI et GSM, et la nature de la cargaison au cours des différentes étapes de maturation (exemple des cellules PC12). D'après Kögel et Gerdes, 2010.

II.2.2.2 Sorting by retention

La maturation des GSI inclut, en plus de leur phénomène de fusion homotypique, un « affinement » de leur contenu ainsi qu'un remodelage membranaire. Durant ce processus, les protéines qui ne sont pas destinées à la voie de sécrétion régulée vont être éliminées des GSI *via* les VCL. Ce processus nommé « sorting by retention » est détaillé plus haut dans ce manuscrit (Arvan and Castle, 1998; Tooze, 1998). Plusieurs protéines ont été décrites comme étant éliminées des GSI en maturation. C'est le cas notamment de protéines intervenant dans le phénomène de fusion homotypique des GSI : la syntaxine 6 (Klumperman et al., 1998; Wendler et al., 2001), la synaptotagmine IV (Ahras et al., 2006; Eaton et al., 2000), et VAMP4 (Eaton et al., 2000). C'est également le cas d'autres protéines destinées de façon aberrante aux GSI : la carboxypeptidase D (Ahras et al., 2006; Dittié et al., 1996, 1997), la furine (Dittié et al., 1997) et le récepteur au mannose 6-phosphate (M6PR), un récepteur d'adressage pour les protéines lysosomales (Klumperman et al., 1998).
Par ailleurs, VAMP4, le M6PR et la furine auraient un rôle central dans la formation des VCL, puisque le domaine cytoplasmique de ces protéines, en interagissant avec la protéine adaptatrice AP-1, permet le recrutement du manteau de clathrine (Dittié et al., 1996, 1997; Hinners et al., 2003).

Le bourgeonnement des VCL prend place rapidement, lors des premières phases de maturation. Au sein des cellules PC12, l'élimination de la furine se déroule entre 12 et 30 minutes après la formation des GSI au niveau du TGN (Rudolf et al., 2001), et l'élimination de VAMP4 *via* les VCL se déroule environ 45 minutes après la formation des GSI au sein des cellules AtT20 (Eaton et al., 2000).

II.2.2.3 Acidification

Par ailleurs, durant la maturation, la lumière des GSI s'acidifie progressivement, entrainant la condensation des molécules cargo solubles à l'origine du cœur dense aux électrons de ces granules. Ce processus est contrôlé par des pompes à protons de type ATPase, transportant les protons dans la lumière des GSI. Cette entrée de protons entraîne une diminution du pH intragranulaire (Jefferies et al., 2008), passant de 6,3 dans les GSI à 5 – 5,5 dans les GSM (Urbé et al., 1997). Dans les cellules PC12, ce processus d'acidification se déroule en 90 minutes environ (Urbé et al., 1997). Le gradient de protons qui en résulte, permet l'entrée des monoamines provenant du cytosol (Johnson, 1988) et active également les pro-hormones convertases PC1/3 et PC2 afin de transformer les prohormones / proneuropeptides en molécules biologiquement actives (Seidah et al., 1993; Steiner, 1998).

Lorsque ces différentes étapes, fusion homotypique, sorting by retention et acidification, sont menées à leur terme, le GSCD est mature et peut fusionner avec la membrane plasmique afin de déverser son contenu dans le milieu extracellulaire.

III. La biogénèse des granules de sécrétion à cœur dense

III.1 Rôle des granines

III.1.1 Présentation des granines

Les protéines solubles des GSCD ont été découvertes en 1958 (Hillarp, 1958). C'est en 1965 que Banks et Helle découvrent la Chromogranine A (CgA), premier membre de cette famille de protéines, qui est libérée avec les catécholamines lors de l'exocytose (Banks and Helle, 1965) mais ce n'est qu'en 1967, qu'elle est ainsi nommée (Blaschko et al., 1967). Ensuite, d'autres protéines aux structures et propriétés similaires ont été découvertes et classées dans la famille des granines qui comporte à présent 9 membres (Bartolomucci et al., 2011; Chakraborty et al., 2006; Helle, 2004). Les granines sont les principaux constituants des GSCD, et les 9 membres de cette famille sont les suivants : la CgA, la chromogranine B (CgB ou sécrétogranine I), la sécrétogranine II (SgII, ou chromogranine C), la sécrétogranine III (SgIII), la sécrétogranine IV (SgIV), la sécrétogranine V (SgV, 7β2), la sécrétogranine VI (SgVI, NESP 55), la sécrétogranine VII (SgVII, VGF) et la sécrétogranine VIII (SgVIII, proSAAS). L'ensemble de ces granines forment une famille de glycophosphoprotéines solubles ayant des caractéristiques structurales similaires, leur permettant ainsi d'avoir un rôle clé dans la biogénèse des GSCD et dans la sécrétion de prohormones (Bartolomucci et al., 2011). En effet, les granines possèdent une forte proportion d'acides aminés acides (180 à 700 résidus) ainsi qu'une capacité élevée à lier le calcium, propriétés qui soutiennent leur capacité à s'agréger les unes avec les autres et avec des prohormones, dans des conditions de pH acide et de forte concentration calcique (Elias et al., 2010). Les granines possèdent également plusieurs sites dibasiques, qui, grâce à leurs propriétés biochimiques, vont être la cible de différentes endopeptidases telles que les sérines protéases (Dillen et al., 1993; Eskeland et al., 1996), les PCs (au niveau du TGN et des GSCD), la kallikréine et la plasmine au moment de l'exocytose dans la circulation sanguine (Helle, 2004; Metz-Boutigue et al., 1993; Parmer et al., 2000) et la cathepsine L dans les granules en formation (Biswas et al., 2009). Les peptides générés sont biologiquement actifs (Montero-Hadjadje et al., 2008) et ont des effets autocrines, paracrines et endocrines (Eiden, 1987; Taupenot et al., 2003). Ces sites dibasiques au sein des granines peuvent interagir avec des récepteurs de tri (comme par

exemple la CPE), ou avec les lipides (comme par exemple le cholestérol) entraînant ainsi des agrégats dirigés vers les GSCD (Elias et al., 2010) (Hosaka et al., 2004). Les granines, présentes à de très fortes concentrations au sein des GSCD des cellules chromaffines (1800 µM pour la CgA, 200 µM pour la CgB et 30 µM pour la SgII dans le cas des cellules chromaffines bovines), et en raison de leur faible affinité et de leur grande capacité à lier le calcium, peuvent également concentrer les catécholamines au sein des GSCD afin de contrôler leur libération durant l'exocytose (Estevez-Herrera et al., 2013; Machado et al., 2010). La diversité des granines partageant des caractéristiques structurales communes, mais avec des fonctions différentes, implique une variété de populations de GSCD dont l'existence et la fonction restent à établir dans un type de cellule neuroendocrine donné.

Les rôles et les fonctions des différentes granines ont été abordés dans un chapitre de livre, paru en en 2017 dans *« Chromogranins: from Cell Biology to Physiology »*, auquel j'ai contribué et qui est en annexe de mon manuscrit. Concernant la suite de mon manuscrit, je me focaliserai sur la granine étudiée pendant ma thèse, à savoir, la CgA.

III.1.2 La chromogranine A

III.1.2.1 Structure et organisation de la protéine, structure du gène

La CgA est une protéine acide constituée de 439 résidus (457 avec la séquence du peptide signal) chez l'homme et 431 (449 avec la séquence du peptide signal) chez le bœuf (Iacangelo et al., 1991; Winkler and Fischer-Colbrie, 1992). Le gène codant la CgA est localisé différemment selon les espèces, chromosome 14 chez l'homme (position 14q32.12), et chromosome 21 chez le bœuf. La masse moléculaire de la CgA est de 49 kDa chez l'homme et 48 kDa chez le bœuf mais sur gel SDS-PAGE, elle est détectée à 70 kDa du fait des modifications post-traductionnelles qu'elle subit, et des charges négatives qu'elle porte retardant la migration au sein du gel d'acrylamide. La comparaison des séquences de la CgA chez les vertébrés, montre que les domaines N- et C-terminaux de la CgA (CgA_{1-76} et $CgA_{344-377}$) sont très conservés au cours de l'évolution, suggérant que ses domaines terminaux sont indispensables à l'activité biologique de la protéine (Montero-Hadjadje et al., 2008). Pour la suite de cette partie, je vais me focaliser sur la CgA humaine (*h*CgA) **(Figure n°8).**

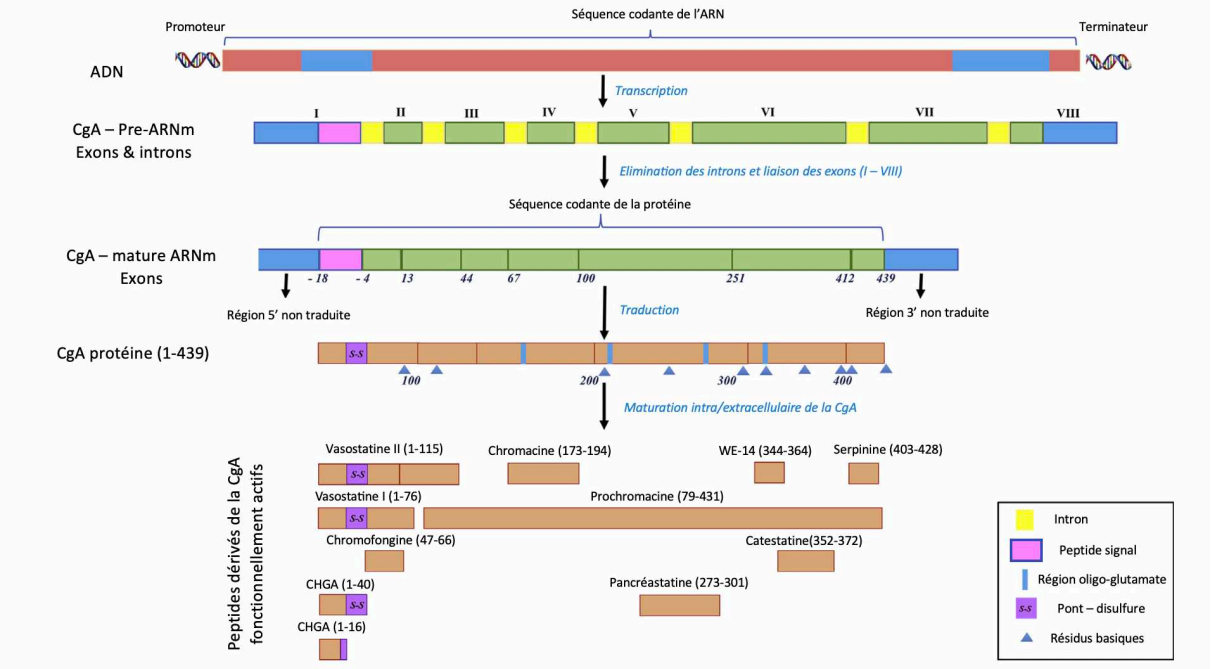


Figure n°8. Structure du gène, du transcrit, de la protéine et des peptides biologiquement actifs dérivés de la CgA. Le gène humain codant la CgA est localisé au niveau du 14ème chromosome et est composé de 8 exons et 7 introns. Le transcrit est traduit en protéine ayant un poids d'environ 49 kDa. Le clivage protéolytique de la CgA par les pro-hormones convertases génère des peptides dérivés biologiquement actifs. Les chiffres romains indiquent les séquences exoniques de l'ARNm et les chiffres arabes la position des acides aminés dans la protéine mature. Adapté de Eissa et al., 2018.

La *h*CgA possède 10 sites dibasiques, sites potentiels pour le clivage protéolytique (Konecki et al., 1987), ainsi qu'une structure hélicoïdale (Mosley et al., 2007). Le gène *CHGA* codant la *h*CgA est organisé en 8 exons et 7 introns, dont les rôles sont détaillés dans le tableau ci-dessous (Bartolomucci et al., 2011).

Organisation génomique de *h*CgA	Rôles des exons
Exon I	Code la région 5'-UTR (*untranslated region*) et pour une partie du peptide signal de la CgA.
Exon II – V	Code la vasostatine I ($hCgA_{1-76}$), peptide vasorelaxant et cardiosuppressif (Aardal et al., 1993).
Exon III	Code des résidus cystéine hautement conservés formant une boucle disulfure au sein de la CgA.
Exon V – VI	Code une séquence peptidique très variable selon les espèces.
Exon VII	Code :

	- La pancréastatine ($hCgA_{273-301}$), une hormone dysglycémiante (Tatemoto et al., 1986). - La catestatine ($hCgA_{352-372}$), peptide inhibiteur de la libération des catécholamines et hypertensif (Mahata et al., 1997). - Le WE-14 ($hCgA_{344-364}$), auto-antigène dans le diabète de type I (Stadinski et al., 2010).
Exon VII – VIII	Code la serpinine ($hCgA_{403-428}$), peptide pro-adrénergique (Mahata and Corti, 2019)
Exon VIII	Code la région 3'-UTR

Tableau n°1. Rôles de chacun des exons constituant le gène *CHGA*.

La CgA est produite et stockée, entre autres, dans les cellules endocrines et neuroendocrines telles que les cellules hypophysaires, les cellules C de la thyroïde, les cellules de la parathyroïde, les cellules chromaffines de la médullosurrénale et les cellules neuroendocrines du tractus intestinal et pulmonaire (Fischer-Colbrie et al., 1995; Montero-Hadjadje et al., 2008; Winkler and Fischer-Colbrie, 1992). Par ailleurs, la CgA est présente dans de nombreuses espèces telles que l'homme, le boeuf, le rat, la souris, l'anguille, la grenouille. L'expression et la proportion des granines varient d'une espèce à l'autre ; par exemple, dans les cellules chromaffines bovines, c'est la CgA qui prédomine, contrairement aux cellules chromaffines de mouton ou de cheval. Tandis que chez l'homme, c'est la CgB qui semble être prédominante dans les cellules chromaffines, tout comme chez le rat et la souris (Fischer-Colbrie and Schober, 1987). La CgA reste la plus étudiée puisque la plupart des études sont réalisées sur les cellules chromaffines bovines, la médullosurrénale de bœuf permettant d'en récupérer un grand nombre plus facilement. L'organisation et la séquence des gènes de la CgA et de la CgB présentent des similitudes au niveau des régions codant pour les domaines N- et C-terminaux. Par ailleurs, leur premier exon code pour le peptide signal et leur troisième exon code pour les cystéines à l'origine du pont disulfure (Winkler and Fischer-Colbrie, 1992). Ces similarités laissent suggérer que les gènes codant la CgA et la CgB dériveraient d'un ancêtre commun (Montero-Hadjadje et al., 2008).

Les cellules chromaffines bovines, modèles de choix pour l'étude de la sécrétion neuroendocrine, ont été utilisées dans de nombreuses études afin de comprendre les mécanismes d'expression et d'action de la CgA au sein des cellules neuroendocrines. La

sécrétion des catécholamines par les cellules chromaffines est principalement induite par des stimuli sympathiques issus du nerf splanchnique. Étant donné que la CgA est co-stockée et co-libérée avec les catécholamines lors de l'exocytose, il a été postulé que sa biosynthèse se produit durant ou après l'exocytose, en réponse à la stimulation des cellules chromaffines (Mahata et al., 2002). En effet, différentes études ont mis en évidence une activation de la transcription du gène *CHGA* suite à des stimuli cholinergiques et peptidergiques (Mahata et al., 2002), du fait de la présence de sites CRE (cAMP response elements), indispensables à la transcription du gène. Ces études ont également permis de mettre en évidence les voies de transduction impliquées dans la transcription, comme par exemple dans les cellules PC12, où la nicotine, le PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide) et la sécrétine induisent la transcription du gène *CHGA via* l'activation des protéines kinases A et C, des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) et du facteur de transcription CREB (Mahapatra et al., 2003; Tang et al., 1998; Taupenot et al., 1998). L'œstradiol est également capable d'inhiber l'expression de la CgA dans les cellules gonadotropes de rat influençant ainsi la sécrétion de LH (Anouar et al., 1991).

III.1.2.2 Modifications post-traductionnelles

Suite à sa synthèse, la CgA subit de nombreuses modifications post-traductionnelles. Cela débute par le clivage du peptide signal, puis la formation du pont disulfure dans le RER, et les O-glycosylations, sulfatations et phosphorylations dans l'appareil de Golgi. Enfin, l'amidation C-terminale se met en place pour les fragments générés au cours de la maturation intragranulaire (Metz-Boutigue et al., 1993; Strub et al., 1997). L'analyse de la CgA bovine a révélé l'existence d'un pont disulfure et de 7 modifications de type O-glycosylation ou phosphorylation (Strub et al., 1997) **(Figure n°9).**

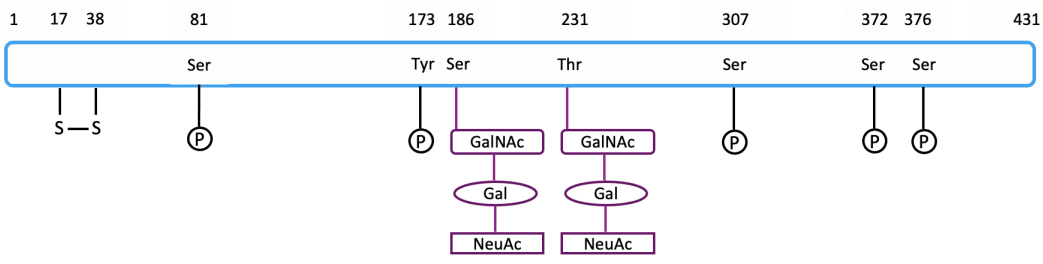


Figure n°9. Position des modifications post-traductionnelles de la *b*CgA (CgA bovine). Ser, Tyr et Thr représentent les résidus sérine, tyrosine et thréonine respectivement. P : sites de phosphorylations au niveau des résidus Ser^{81}, Tyr^{173}, Ser^{307}, Ser^{372} et Ser^{376}. GalNAc, Gal et NeuAc : sites de O-glycosylation sur les Ser^{185} et Thr^{231}. S – S : pont disulfure formé entre les cystéines situées en positions 17 et 38 de la CgA. Adapté de Strub et al., 1997.

III.1.2.3 Rôles dans la biogénèse des GSCD et dans la sécrétion régulée

Section abordée dans la revue publiée en 2020 dans le journal *IUBMB Life*, pour laquelle je signe en tant que première auteure et qui se trouve en annexe de mon manuscrit.

III.2 Rôle du pH

Les études réalisées en microscopie électronique par l'équipe de Orci et collaborateurs (Orci et al., 1987) ont montré, de façon préliminaire, que les protéines des GSCD formaient des agrégats au niveau du TGN, au sein des cellules endocrines. Cette équipe, et bien d'autres, ont également mis en évidence que le pH au niveau du TGN est légèrement acide, de l'ordre de 6 – 6,5 (Dannies, 2012; Demaurex et al., 1998; Machen et al., 2003; Orci, 1986). Par ailleurs, des études menées *in vitro* ont mis en évidence que les prohormones et les granines pouvaient s'agréger entre elles, ou avec d'autres protéines destinées à la voie de sécrétion régulée dans ces conditions de pH acide (Rindler, 1998; Sobota et al., 2009). Taupenot et collaborateurs ont par la suite montré que le traitement de cellules PC12 avec la bafilomycine A1, un inhibiteur de la pompe à protons H-ATPase, entraîne une diminution du nombre de GSCD ainsi qu'une diminution de la sécrétion de CgA (Taupenot et al., 2005) **(Figure n°10).** Cette étude a confirmé et montré que *(i)* l'acidification au niveau du TGN et des GSCD est permise par des pompes à protons H-ATPase et V-ATPase (Wu et al., 2001) et que *(ii)* l'acidification au niveau du TGN est un élément clé de l'agrégation des granines et de la biogénèse des GSCD.

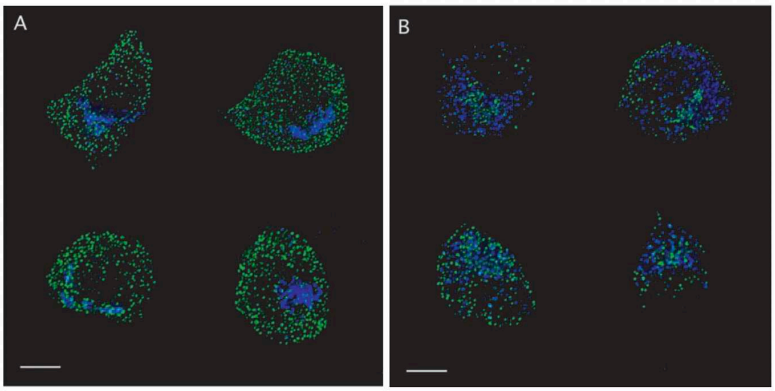


Figure n°10. Effet du pH sur la distribution subcellulaire de la CgA. Les cellules PC12 co-transfectées avec pCMV-CgA-EGFP (marquant les granules de sécrétion en vert) et avec le plasmide d'expression codant pour la séquence de ciblage de la β1,4-galactosyltransférase fusionnée à la CFP (GalT-CFP, marquant l'appareil de Golgi en bleu) ont été exposées à un milieu contrôle *(A)* ou à un milieu contenant la bafilomycine A1 à une concentration de 10 nM *(B)* pendant 22 h. Les barres d'échelles représentent 5 µm. D'après Taupenot et al., 2005.

III.3 Rôle du calcium

En plus du rôle du pH acide, le calcium est également requis pour l'agrégation des protéines dans les GSCD. Cela a été montré pour les prohormones, les prohormones convertases, la CPE et les granines (Dikeakos et al., 2009; Rindler, 1998; Shennan et al., 1994). Cependant, certaines protéines destinées à la voie de sécrétion régulée semblent pouvoir se passer de ces mécanismes pour réaliser leur agrégation. C'est par exemple le cas de la POMC, qui s'agrège pour emprunter la voie de sécrétion régulée indépendamment du pH et du calcium (Cawley et al., 2000).

Le mécanisme par lequel le calcium parvient dans des compartiments acides tels que les GSCD et le TGN n'est pas clairement défini chez les mammifères (Rosado, 2011). Pittman, dans sa revue en 2011, a avancé une hypothèse selon laquelle les pompes calciques vacuolaires seraient liées aux pompes ATPases calcium-dépendantes de la membrane plasmique des cellules de mammifères, et les échangeurs Ca^{2+}-H^{+} auraient été perdus dans les génomes des mammifères durant l'évolution (Pittman, 2011). Néanmoins, des activités de transporteurs de calcium ATP-dépendants et des échanges entre le Ca^{2+} et les H^{+} ont été détectés dans certains compartiments acides, suggérant une possible conservation du mécanisme, peut-être par le biais d'homologues qui n'ont pas encore été identifiés au niveau moléculaire (Patel and Docampo, 2010).

En revanche, le mécanisme permettant la libération de calcium à partir des GSCD est quant à lui, clairement établi. Cette libération est permise par des membres appartenant à la superfamille des canaux TRP (Transient Receptor Potential) et par les récepteurs à l'IP3 (Inositol Triphosphate Receptors, IP3R) (Patel and Muallem, 2011; Yoo, 2011; Yoo and Hur, 2012). Il a été démontré que la CgA et la CgB interagissent toutes deux avec les IP3R, et que cette liaison active ces récepteurs, dans les conditions de pH acide des GSCD. De plus, dans les conditions intra-granulaires, la CgA et la CgB forment des hétérotétramères qui induisent des changements de conformation des IP3R, entrainant une augmentation de l'affinité de l'IP3 pour son site de liaison, et engendrant ainsi une libération accrue de calcium intra-granulaire vers le cytoplasme (Yoo, 2000). Ce couplage semble jouer un rôle clé dans la signalisation de calcium médié par l'IP3 au sein du cytoplasme. Ainsi, le calcium intra-golgien et intra-granulaire serait une source importante pour l'agrégation des protéines destinées à la voie de sécrétion régulée et peut-être également, pour la signalisation cellulaire.

Par ailleurs, Yoo en 2000 (Yoo, 2000) a émis une hypothèse pouvant à la fois expliquer la pénétration et la libération du calcium au sein des GSCD, donnant ainsi un rôle clé aux GSCD comme régulateur de la concentration de calcium intracellulaire. En effet, les IP3R

semblent pouvoir permettre la libération (comme expliqué ci-dessus) mais également l'entrée de calcium (Ferris et al., 1989) au sein des GSCD. Ainsi, il serait possible que le calcium cytosolique puisse pénétrer dans les GSCD *via* divers échangeurs calciques (Kostron et al., 1977; Krieger-Brauer and Gratzl, 1982; Monkawa et al., 1995; Nicaise et al., 1992) mais également *via* les récepteurs IP3. Bien que les mécanismes permettant l'entrée du calcium dans les GSCD soient encore peu connus, l'environnement calcique intra- et extra-granulaires permettrait que les GSI, ayant une faible concentration calcique ('b', **Figure n°11**) se dirigeant vers la membrane plasmique, puissent séquestrer une partie du calcium relargué par les GSM, arrimés à la membrane plasmique et pouvant contenir jusqu'à 100 mM de calcium avant la fusion (Heidelberger et al., 1994; Llinás et al., 1992) ('a', **Figure n°11**). De ce fait, les GSI en route vers la membrane plasmique contiendront une concentration intragranulaire en calcium importante lorsqu'ils atteindront la membrane plasmique. La principale raison de cette séquestration potentielle du calcium extra-granulaire pourrait concorder avec la présence intragranulaire de la CgA et de la CgB entre autres, qui ont une forte affinité pour le calcium. Cette hypothèse est résumée en **Figure n°11.**

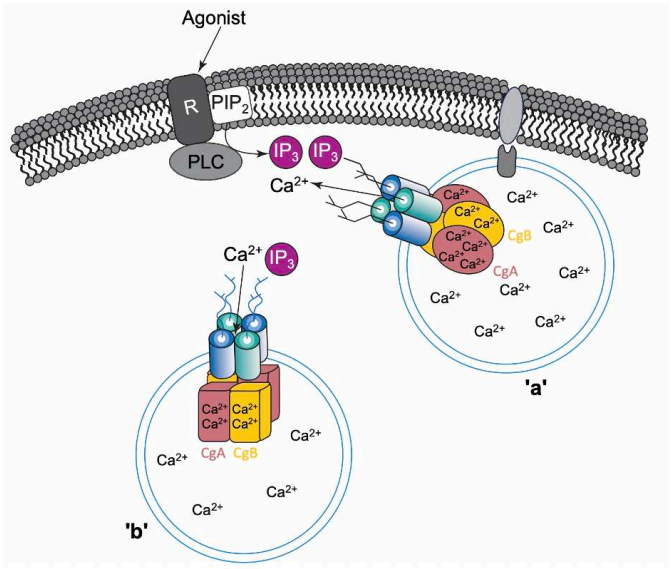


Figure n°11. Modèle illustrant l'action de l'interaction entre l'IP3R et la CgA/CgB sur des GSM et GSI.
La production d'IP_3 est le résultat d'une stimulation agoniste d'un récepteur situé au niveau de la membrane plasmique. L'IP_3 produit pourra aller se fixer au niveau des IP_3R situé au niveau de la membrane des GSM ('a'), accostés et arrimés à la membrane plasmique, entrainait une libération du Ca^{2+} intragranulaire. En effet, ces GSM contiennent une forte concentration en Ca^{2+} pouvant être en parti libéré lorsque l'IP_3 se fixe sur son récepteur.
En revanche, l'IP_3 pourrait également se fixer au niveau IP_3R des GSI ('b'), situés plus profondément dans le cortex d'actine. Dans ce cas, la fixation de l'IP_3 sur son récepteur permettrait aux GSI de « séquestrer » le Ca^{2+} libérer par les GSM ('a'), entrainant une augmentation de la concentration intragranulaire de Ca^{2+} dans les GSI, leur permettant ainsi de devenir des GSM.
La liaison de CgA et CgB avec les IP_3R est indispensable à leur fonctionnement.
Abréviations: IP3 : inositol 1,4,5-trisphosphate ; PIP2 : phosphatidylinositol 4,5-biphosphate ; PLC : phospholipase C ; CgA : chromogranine A ; CgB : chromogranine B. D'après Yoo et al., 2000.

III.4 Rôle des protéines solubles

Depuis plus de 20 ans, un grand nombre de signaux ont été proposés pour les mécanismes de tri et de sortie des protéines destinées aux GSCD à partir du TGN (Dikeakos and Reudelhuber, 2007). Ces signaux ont été montrés comme étant complexes, variables selon les protéines et selon les types cellulaires. Les protéines destinées aux GSCD sont de 2 classes :

- Les protéines solubles :
    - Cellules endocrines : pro-hormones
    - Cellules neuronales : BDNF (brain-derived neurotrophic factor)
    - Cellules endocrines, neuronales et exocrines : granines
- Les protéines liées à la membrane : PCs, CPE, phogrine et mucine

En ce qui concerne les pro-hormones solubles, le signal permettant l'adressage de la POMC, de la pro-insuline, de la pro-enképhaline et du BDNF au sein de la voie de sécrétion régulée a été identifié. En effet, des études menées par mutagénèse dirigée ont permis de mettre en évidence un motif de tri consensus, dépendant de la conformation correspondant à deux résidus acides exposés à la surface des molécules et deux résidus hydrophobes disposés à 5 à 7 Å des résidus acides (Cool et al., 1997; Dhanvantari et al., 2003). De plus, il a été montré que ce signal interagit avec la CPE pour contrôler la sortie de ces pro-hormones vers la voie de sécrétion régulée. Ce motif se situe par exemple pour la POMC au niveau de son pont disulfure N-terminal (Cool et al., 1995), et pour la pro-enképhaline, entre les résidus 1-32 N-terminaux (Loh et al., 2002). Il est important de noter que la localisation de ce motif est pro-hormone-dépendant et qu'il ne peut être identifié que si la conformation ou la structure cristallisée des protéines est disponible, rendant son identification possible que dans un nombre limité de pro-hormones et pro-neuropeptides.

Par ailleurs, les résidus basiques appariés seraient impliqués dans l'adressage de la pro-rénine (Brechler et al., 1996), de la pro-neurotensine (Feliciangeli et al., 2001), de la pro-gastrine (Bundgaard et al., 2004), et de la proTRH (proThyrotropin Releasing Hormone) (Mulcahy et al., 2006) au sein de la voie de sécrétion régulée, ce qui en fait un autre signal de tri potentiel. Cependant, le mécanisme impliqué n'est pas clair. Il semblerait que les résidus basiques de la protéine destinée aux GSCD soient clivés par une PC (au niveau du TGN et/ou des GSI ayant un pH acide) afin que la protéine soit correctement adressée dans les GSI. Pour soutenir cette hypothèse, il a été montré que la mutation d'une séquence de clivage spécifique de la furine dans un peptide destiné à la voie de sécrétion constitutive redirige ce pro-peptide vers la voie de sécrétion régulée (Brechler et al., 1996).

Différents signaux d'adressage aux GSCD ont également été identifiés au sein des granines. L'extrémité N-terminale de la CgA (résidus 40-115) est nécessaire à son adressage dans les GSCD, au sein des cellules PC12 (Taupenot et al., 2002). Cette région correspond à la région (48-95) de la CgA, mise en évidence par Hosaka et al en 2002, comme interagissant avec la SgIII, qui servirait ainsi de récepteur d'adressage à la membrane du TGN pour la CgA (Hosaka et al., 2002). Cependant, le domaine d'interaction de la CgA avec la SgIII n'est pas conservé au cours de l'évolution et la SgIII n'est pas exprimée de façon ubiquitaire, suggérant que le processus de tri est probablement dépendant du type cellulaire et que différents mécanismes de tri des granines et des hormones restent à élucider.

III.5 Rôle des protéines et récepteurs membranaires

Pour ce qui est de l'adressage des protéines associées à la membrane des GSCD, le tri vers la voie régulée se produit du fait de leur localisation à la membrane du TGN. Cette section est discutée au sein de la revue Laguerre et al., IUBMB Life, 2020, située en annexe de ce manuscrit.

Par ailleurs, certaines protéines transmembranaires semblent essentielles pour la formation et la fonction des GSCD. C'est notamment le cas des aquaporines, qui ont la capacité de transporter sélectivement les molécules d'eau. (Gravelle et al., 2015).

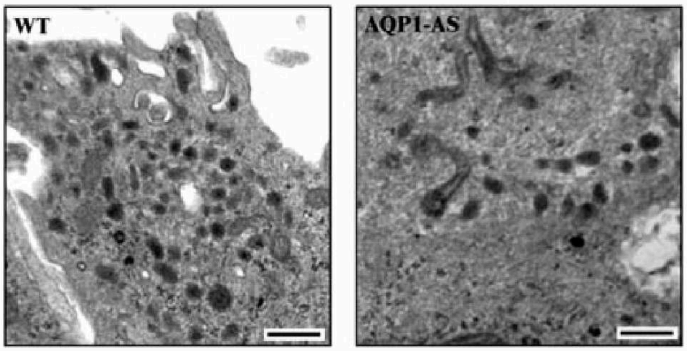


Figure n°12. L'inhibition de l'expression de AQP1 entraîne une diminution du nombre de GSCD. Images de microscopie électronique illustrant la distribution des GSCD au sein de cellules AtT20 sauvages (WT) et exprimant un siARN dirigé contre AQP1 (AQP1-AS). Les barres d'échelle représentent 500 nm. D'après Arnaoutova et al., 2008.

Parmi les aquaporines, AQP1 est présente à la membrane des GSCD des cellules hypophysaires, des cellules chromaffines et des cellules pancréatiques, tandis que AQP5 est présente à la membrane des GSCD des cellules de la glande parotide (Arnaoutova et al., 2008; Cho et al., 2002; Francone et al., 2010). AQP1 est également présente à la membrane

du TGN (Francone et al., 2010), permettant ainsi l'élimination d'eau à la fois au niveau du TGN et des GSCD, afin de faciliter la condensation des agrégats protéiques destinés à la voie de sécrétion régulée au niveau du TGN et durant la maturation des GSCD. Il a été montré que l'inhibition de l'expression de AQP1 au sein de cellules adénohypophysaires AtT-20 entraîne une diminution significative du nombre de GSCD contenant l'ACTH (Arnaoutova et al., 2008) **(Figure n°12)**. Une diminution de l'expression de POMC est également observée dans les cellules hypophysaires de souris KO pour AQP1 (Gondré-Lewis et al., 2012). Ainsi, il semblerait que AQP1 soit un régulateur clé intervenant dans l'agrégation et l'adressage des protéines destinées à la voie de sécrétion régulée, permettant ainsi la biogénèse des GSCD.

Enfin, l'adressage peut également être assuré par des récepteurs membranaires. En effet, il semblerait que le tri des protéines solubles telles que les pro-hormones, les pro-neuropeptides, ou les granines pour l'entrée dans les GSCD nécessite une interaction des agrégats avec un récepteur membranaire au niveau du TGN. L'exemple de la SgIII, qui servirait de récepteur de tri pour la CgA, afin de l'adresser à la voie de sécrétion régulée (Hosaka et al., 2002) a été précédemment décrit, de même que la forme transmembranaire de la CPE qui lie le motif consensus tri-dimensionnel dépendant de la conformation au sein de la POMC, de la pro-insuline, de la pro-enképhaline, du pro-NPY et du BDNF. Il a été mis en évidence que le signal formé par les 2 résidus acides présents dans le pro-BDNF interagisse spécifiquement avec deux résidus basiques, R255 et K260, présents dans la séquence de la CPE. Cette interaction semble contrôler l'adressage du pro-BDNF au sein de la voie régulée (Cool et al., 1997). Une étude réalisée *in vivo* est venue appuyer cette hypothèse, puisque des souris KO pour la CPE présentent une altération de l'adressage du BDNF étant donné qu'il est sécrété de façon constitutive par les neurones corticaux et hippocampiques de ces souris (Lou et al., 2005). Par ailleurs, l'équipe de Loh a montré, un défaut de la sécrétion régulée d'ACTH par les cellules de l'antéhypophyse de souris KO CPE, suggérant que la POMC et la CPE interagissent afin de faciliter l'adressage de la POMC dans les GSCD (Cool et al., 1997; Shen and Loh, 1997). De façon intéressante, ces cellules sont capables de sécréter la POMC suite à une stimulation (Hosaka et al., 2005). Plus récemment, il a été montré que la SgIII interagit avec la POMC, de façon moins affine que la CPE, et que la SgIII agit de ce fait comme récepteur d'adressage pour la POMC. En effet, la surexpression de SgIII dans les souris KO pour la CPE compenserait l'absence de CPE et agirait comme récepteur de tri de la POMC (Cawley et al., 2016).

III.6 Rôle des protéines cytosoliques

Plusieurs catégories de protéines cytosoliques jouent un rôle essentiel dans la formation des GSCD ainsi que dans la formation de courbure membranaire nécessaire à ce processus. C'est notamment le cas des GTPases des familles Arf et Rab. Les protéines de la famille Arf (Arf1 et Arf6 notamment) favorisent la courbure membranaire grâce à l'insertion de leur hélice α dans le feuillet cytosolique de la membrane plasmique (Lundmark et al., 2008). En ce qui concerne Arf1, ce processus est accentué grâce à son homo-dimérisation induite par sa liaison au GTP (Beck et al., 2008). Pour les GTPases de la famille Rab, deux membres : Rab2 et Rab6 sont particulièrement impliquées dans le bourgeonnement de la membrane de l'AG. Chez *C. Elegans*, UNC-108 (équivalent de Rab2 chez les mammifères) est localisée dans le corps cellulaire des neurones et présente une co-localisation avec des marqueurs spécifiques de l'AG. Le mutant d'UNC108/Rab2 présente des déficits de déplacement, ainsi que des variations de taille des GSCD des neurones peptidergiques. En effet, leurs GSCD sont légèrement plus volumineux, mais le nombre, le diamètre et leur capacité à sécréter leur contenu ne sont pas différents de ceux des neurones provenant d'organismes sauvages. Cependant, même si les GSCD mutants ont un contenu normal en neuropeptides, des études indiquent que 2/3 du contenu des GSI sont déplacés vers les endosomes. Il semble que le déficit d'UNC-108 n'impacte pas la formation des GSI, mais intervient plutôt dans sa fonction coopérative avec son effecteur RIC-19 et serait impliqué dans la rétention du contenu des GSCD pendant leur maturation (Edwards et al., 2009; Sumakovic et al., 2009). Par ailleurs, Rab6 a été montré comme induisant la fission de vésicules de transport au niveau de l'AG (Miserey-Lenkei et al., 2010).

Les protéines du manteau ont été démontrées dans la littérature comme pouvant également jouer ce rôle. Des observations de cellules endocrines en microscopie électronique ont montré que la clathrine pouvait être impliquée dans la formation des vésicules constitutives et des GSCD au niveau du TGN (Tooze and Tooze, 1986). En effet, la liaison de la protéine adaptatrice AP-1, qui permet la liaison du manteau de clathrine, autour des GSI est régulée par Arf1 dans les cellules neuroendocrines PC12 (Dittié et al., 1996). D'autres protéines cytosoliques, présentant un domaine de liaison à AP-1 ou GGA (protéine de liaison au facteur d'ADP – ribosylation) participent également à la formation du manteau de clathrine lors de la granulogénèse. C'est notamment le cas de PACS-1 qui permet la liaison d'AP-1 sur les acides aminés acides de la région cytosolique de la furine, protéine enchâssée dans la membrane du TGN (Crump et al., 2001), ou encore l'epsine-R qui lie le PI4P, la clathrine et AP-1 (Mills et al., 2003).

Un rôle de la protéine AP-3 a également été mis en évidence dans la formation des GSCD au niveau du TGN. En effet, l'inhibition de son expression par une stratégie d'ARN interférent dans des cellules PC12 entraîne des défauts de taille, de morphologie et une diminution du nombre de GSCD (Asensio et al., 2010). Une autre étude montre que l'invalidation du gène codant pour AP-3 chez la souris entraîne un défaut de sécrétion de l'insuline et du glucagon (Sirkis et al., 2013).

Les myosines sont une autre classe de protéines cytosoliques intervenant dans ce processus. Par exemple, Rab6 s'associe à la myosine II et à la F-actine pour favoriser la fission de compartiments post-golgiens après leur bourgeonnement depuis le TGN au sein de cellules HeLa. En effet, l'inhibition de l'expression de la myosine II et la dépolymérisation des filaments d'actine altèrent le processus de fission, et entraînent l'apparition de structures tubulaires Rab6-positives, suggérant que Rab6 est un effecteur de la myosine II et de la F-actine. Il semblerait que la myosine II, en interagissant avec l'actine, favorise la traction des vésicules en cours de bourgeonnement pour ensuite les diriger vers les microtubules, où elles seront prises en charge par les moteurs moléculaires tels que la kinésine 1 (Miserey-Lenkei et al., 2010). Une autre myosine, la myosine 1b est également impliquée dans l'initiation de la formation de transporteurs post-golgiens en régulant l'assemblage de la F-actine et en remodelant la membrane du TGN (Almeida et al., 2011).
La F-actine intervient également dans la formation des vésicules en partance de l'AG, en entourant la face cytoplasmique du complexe golgien (Dubois et al., 2005; Fucini et al., 2000; De Matteis and Luini, 2008; Miserey-Lenkei et al., 2010). Au sein de cellules AtT20, il a été montré un recrutement de la F-actine et de la γ-adducine (protéine cytosolique associée à l'actine, liant la calmoduline) dans la région péri-golgienne, la protéine γ-adducine étant capable d'interagir avec la queue cytoplasmique de la CPE, et avec des GSCD contenant la POMC/ACTH (Lou et al., 2010). La mutation de l'extrémité C-ter de la γ-adducine induit la perte de son interaction avec la CPE et une désorganisation de la F-actine, ce qui entraîne l'inhibition de la libération de la POMC/ACTH et l'accumulation de la POMC au sein du complexe golgien. Une diminution du nombre de GSCD est également observée. La γ-adducine permettrait donc de recruter la F-actine au niveau des GSI pour faciliter leur fission au TGN (Lou et al., 2013).

Enfin, les protéines à domaine BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs) sont également impliquées dans ce phénomène. C'est notamment le cas de l'arfaptin-1 qui a été proposée comme influençant la taille des GSCD contenant l'insuline en régulant la scission des GSI au niveau du TGN (Gehart et al., 2012). D'autres protéines à domaine BAR ; Pick1 et ICA69 ont la

capacité d'interagir avec les GSI pour réguler leur nombre ainsi que leur taille (Cao et al., 2013; Holst et al., 2013).

III.7 Rôle des modifications post-traductionnelles

Durant leur transit à travers le RER puis le complexe golgien, les protéines destinées à être sécrétées de manière régulée vont subir des glycosylations (Fisher and Ungar, 2016). À ce dernier niveau, certaines de ces protéines préalablement glycosylées seront également modifiées par sulfatation (Makowski et al., 2017; Metz-Boutigue et al., 1993). La glycosylation, la phosphorylation ou la sulfatation peuvent affecter les interactions protéiques requises pour l'adressage de certaines protéines vers la voie régulée. Citons l'exemple du transporteur de monoamines VMAT2 qui possède une N-glycosylation au niveau de sa boucle luminale nécessaire pour son adressage à la voie régulée (Yao and Hersh, 2007). En effet, l'inhibition de cette glycosylation en utilisant le 1-déoxymannojirimycine, un inhibiteur spécifique de l'α-mannosidase 1, entraîne l'adressage de VMAT2 à la voie de sécrétion constitutive, au sein des cellules PC12. Malgré tout, la glycosylation n'affecte pas toujours l'adressage des protéines à la voie régulée. C'est le cas par exemple de la cathepsine G qui n'est pas dépendante de glycosylation pour sa maturation, son activation et sa sécrétion (Garwicz et al., 1995). En effet, la forme mutée de la cathepsine G dépourvue de son site de glycosylation fonctionnel est tout de même sécrétée de façon régulée au sein de polynucléaires neutrophiles. De même, l'adressage de la POMC/ACTH vers la voie régulée n'est pas affecté par l'inhibition de sa glycosylation ou de sa sulfatation (Moore H.P., 1987). D'autres protéines peuvent emprunter la voie de sécrétion régulée malgré l'absence de glycosylation, c'est le cas du facteur neurotrophique dopaminergique cérébral (Sun et al., 2011), des enzymes pancréatiques lysosomales (Chu et al., 1990) et de la rénine (Kuliawat and Arvan, 1994), laissant suggérer que la glycosylation n'est pas un mécanisme limitant pour l'adressage de certaines protéines.

En ce qui concerne la phosphorylation, les avis de la communauté scientifique sont divergents. Au sein des neurones cholinergiques, des cellules chromaffines et des cellules PC12, le transporteur vésiculaire de l'acétylcholine (VAChT) est adressé à la membrane plasmique *via* la voie constitutive et recyclé dans des microvésicules de type synaptique *(synaptic - like microvesicles*, SLMV) tandis que les transporteurs vésiculaires de monoamines (VMATs) sont présents au niveau de la membrane des GSCD (Fei et al., 2008). Il a été montré au sein de cellules PC12 déficientes pour la protéine kinase A (PKA), que les VMATs sont localisés dans les SLMV (Yao et al., 2004). De même, le traitement de cellules PC12 avec un inhibiteur de la PKA, le H89, entraîne une accumulation des VMATs dans les SLMVs. Malgré tout, la phosphorylation de la queue cytoplasmique des VMATs semble être catalysée par la

caséine kinase II, plutôt que par la PKA (Krantz et al., 1997), mais il n'est pas certain que cette phosphorylation soit indispensable à l'adressage des VMATs aux GSCD. Il semblerait alors que la PKA soit impliquée dans l'adressage des VMATs aux GSCD de façon indirecte. Il existe cependant un autre élément prouvant l'implication de ces phosphorylations dans le tri des protéines. La phosphorylation réalisée par la protéine kinase C (PKC) au niveau d'un résidu sérine situé dans le domaine cytoplasmique de VAChT est nécessaire à son adressage dans les SLMVs (Cho et al., 2000; Krantz et al., 2000). Une mutation mimant la phosphorylation de la sérine en glutamate entraîne l'adressage de VAChT dans les GSCD, peut-être du fait que la mutation rend le domaine cytoplasmique de VAChT similaire à celui de VMAT2. Malgré tout, il n'existe pas de preuves tangibles indiquant que la phosphorylation coordonne l'adressage de VAChT aux SLMVs et des VMATs aux GSCD.

Prenons un dernier exemple, celui de la furine, qui est une protéine résidente du complexe golgien. Il est décrit que cette protéine est adressée par défaut dans les GSI et qu'elle est éliminée de ceux-ci *via* la voie de sécrétion constitutive – like médiée par la clathrine. Pour que ce mécanisme soit réalisable, le domaine cytoplasmique de la furine interagit avec AP–1 ou avec la protéine GGA permettant alors le recrutement du manteau de clathrine et entrainant l'élimination de la furine des GSI (Park and Loh, 2008). Il a été montré que la caséine kinase II réalise la phosphorylation du domaine cytoplasmique de la furine, ce qui est nécessaire au recrutement de AP–1 ou de GGA (Dittié et al., 1997). Dans ce cas, la phosphorylation du domaine cytoplasmique de la furine est nécessaire à son élimination des GSI.

Cependant, concernant la CgA, protéine majeure des GSCD, il n'existe pas d'éléments prouvant que ses modifications post-traductionnelles (phosphorylations, O-glycosylations) soient nécessaires à son adressage au sein de la voie de sécrétion régulée. Malgré tout, à l'exception de la phosphorylation en position Tyr^{173}, toutes les modifications post-traductionnelles sont localisées dans des régions fortement conservées de la CgA (Strub et al., 1997). Les deux O-glycosylations fixées sur les résidus Ser^{186} et Thr^{231} qui ont probablement une fonction similaire, sont présentes dans des régions conservées de la protéine. Les sites protéolytiques les plus proches de cette région ont été identifiés sur Arg^{115}-Asp^{116} et Arg^{247}-Arg^{248} (Metz-Boutigue et al., 1993), et ainsi, la protéolyse pourrait donner naissance à un long glycopeptide de 132 résidus contenant les deux O-glycosylations. Concernant le domaine C-terminal, on peut supposer que les résidus phosphorylés Ser^{307}, Ser^{372} et Ser^{376} empêchent le clivage naturel sur les sites dibasiques 314–315 et 366–367, car aucun peptide correspondant n'a été trouvé (Metz-Boutigue et al., 1993).
Il semblerait cependant que les modifications post-traductionnelles de la CgA soient liées aux activités biologiques portées par certains peptides dérivants de la CgA puisque ces

modifications concernent des peptides, avec l'exemple de la vasostatine II (1–113) qui contient la phosphorylation Ser^{81} (Helle et al., 1993). Par ailleurs, il a été montré que les O-glycosylations et phosphorylations, sont nécessaires au rôle antibactérien porté par la chromacine (173–186). En effet, ce rôle est corrélé avec la présence de la O-glycosylation sur Ser^{186} et/ou de phosphorylation sur Tyr^{173} (Strub et al., 1996). Enfin, la région CgA (305–309) contient un domaine de liaison au calcium comprenant le résidu Ser^{307} phosphorylé, et il est supposé que la présence de ce groupe phosphate pourrait moduler la liaison du calcium au niveau de la CgA (Strub et al., 1997).

IV. Rôles des lipides membranaires dans la voie de sécrétion régulée

IV.1 Importance des lipides membranaires

Les membranes biologiques sont formées d'un assemblage de molécules lipidiques organisées en double feuillet qui constitue une barrière physique séparant le cytoplasme du milieu extracellulaire, et délimite le cytoplasme du milieu interne des organites tels que le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Plus récemment, de nouveaux rôles ont été attribués aux lipides membranaires en procurant aux membranes des capacités de bourgeonnement, de déformation, de fusion, ou encore de fission, processus clés de nombreuses fonctions physiologiques (division cellulaire, trafic intracellulaire…) (van Meer et al., 2008).

De plus, 5 % des gènes sont consacrés à la synthèse lipidique, suggérant qu'il y a des avantages évolutifs dépendants de ce répertoire lipidique complexe.
Certains lipides ont été décrits dans la littérature comme ayant plus particulièrement un rôle clé dans la voie de sécrétion régulée neuroendocrine. Le premier lipide auquel ce rôle a été attribué est le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PI(4,5)P2), qui intervient à différents niveaux lors de l'exocytose (étapes d'amorçage et de fusion) (Martin, 2015). Les acides gras ont également été proposés comme étant fortement impliqués dans le bon déroulement de l'exocytose de neurotransmetteurs par les vésicules synaptiques. En effet, les acides gras poly-insaturés ω-3 et ω-6 régulent la syntaxine, une protéine membranaire impliquée dans le processus de fusion (Darios et al., 2007). De plus, un nombre grandissant d'études caractérise le cholestérol et l'acide phosphatidique (PA) comme étant des lipides clés de la sécrétion neuroendocrine (Ammar et al., 2013; Tanguy et al., 2016), non seulement en régulant l'exocytose mais également la formation des GSCD.

IV.2 Les lipides de la membrane golgienne

Le développement des approches de lipidomique, et plus précisément de la spectrométrie de masse, a permis de montrer que la membrane golgienne des cellules mammaliennes contient les mêmes lipides que la membrane plasmique, mais en différentes proportions **(Figure n°13),** et par ailleurs, que les deux feuillets de la membrane golgienne sont asymétriques (van Meer and de Kroon, 2011).

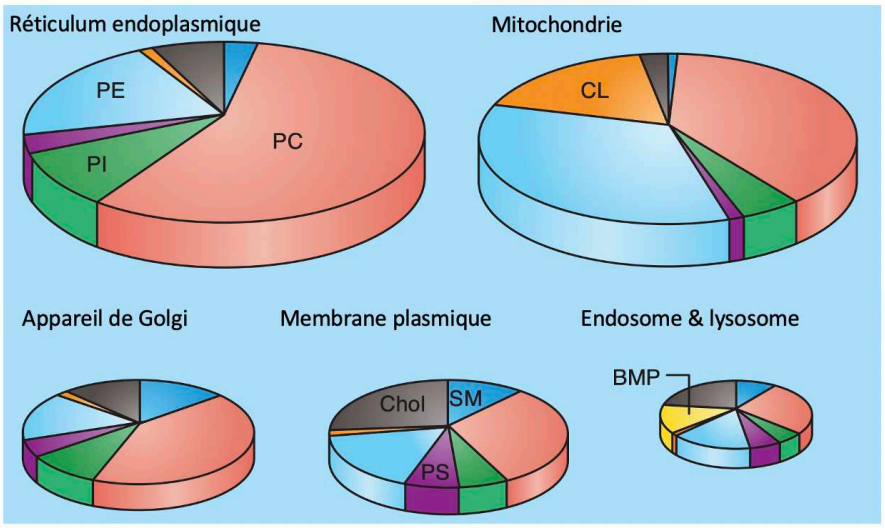


Figure n°13. Proportion des principaux phospholipides et du cholestérol au sein des organites de cellules mammaliennes. Les mêmes lipides sont présents au sein de toutes les membranes mais en quantités variables. *Abréviations : PE : Phosphatidyléthanolamine, PI : Phosphatidylinositol, PC : Phosphatidylcholine, CL : Cardiolipine, Chol : Cholestérol, SM : Sphingomyéline, PS : Phosphatidylsérine, BMP : Bis(monoacylglycero)phosphate.* Adapté de van Meer and de Kroon, 2011.

Ainsi, par exemple, les sphingolipides sont enrichis au niveau du feuillet luminal du complexe golgien alors que le feuillet cytosolique va être quant à lui enrichi en glycérophospholipides, dont la phosphatidylsérine (PS) et la phosphatidyléthanolamine (PE) (van Meer and de Kroon, 2011). Ces glycérophospholipides peuvent être métabolisés pour générer notamment l'acide phosphatidique (PA), le diacylglycérol (DAG) ou les phosphoinositides (PI) (Ha et al., 2012; van Meer et al., 2008).

Par ailleurs, l'appareil de Golgi est un lieu significatif de synthèse et de tri lipidique. Chez les mammifères, ce compartiment est spécialisé dans la synthèse des sphingolipides et dans la production des sphingomyélines (SM), des glycosphingolipides des glucosylcéramides, et des lactosylcéramides (Futerman and Riezman, 2005). Tous ces lipides sont destinés principalement à la membrane plasmique. Qui plus est, la production des sphingolipides semble avoir un rôle important dans l'adressage des protéines membranaires et des lipides entre le RE, la membrane plasmique et les endosomes/vacuoles par

l'intermédiaire des radeaux lipidiques (Zhou and Blom, 2015). Par ailleurs, des enzymes présentes au niveau du RE mais aussi du complexe golgien permettent de réaliser les dernières étapes aboutissant à la production de phosphatidylcholine, appuyant de nouveau le rôle indispensable du Golgi dans l'homéostasie lipidique (Henneberry et al., 2002). De plus, la choline phosphotransférase spécifique de l'appareil de Golgi pourrait quant à elle avoir un rôle dans le contrôle des mécanismes de sécrétion, en régulant les niveaux de DAG, qui possède un rôle important dans la formation des GSCD au niveau du TGN (Xie et al., 2015).

IV.3 Les lipides impliqués dans la formation des GSCD

Lorsque les protéines destinées à la voie de sécrétion régulée sont agrégées entre elles au niveau du TGN, l'étape suivante consiste en la courbure d'une portion de la membrane du TGN puis au bourgeonnement du GSI. Les lipides semblent jouer un rôle important dans ce phénomène de courbure/bourgeonnement, en lien étroit avec certaines protéines. Cependant, à l'heure actuelle la plupart des études sur les rôles des lipides dans le bourgeonnement de vésicules au niveau du TGN portent sur la formation des vésicules constitutives dans des cellules mammaliennes et chez la levure (Corda et al., 2002; Van Meer and Sprong, 2004; Roth, 2004). Seul un nombre restreint d'études se sont concentrées sur le bourgeonnement des GSI au sein de cellules endocrines ou exocrines (Kim et al., 2006; Tooze and Tooze, 1986). Malgré tout, il est tentant de penser que les mécanismes médiés par les lipides pour le bourgeonnement sont similaires. A l'heure actuelle, trois lipides sont décrits comme ayant un rôle clé dans ce processus de bourgeonnement au niveau de la membrane du TGN : le cholestérol (Wang et al., 2000), les PI (Rahajeng et al., 2019) et le PA (Siddhanta and Shields, 1998; Siddhanta et al., 2000).

IV.3.1 Rôle du cholestérol

Le cholestérol est le lipide qui a été le plus étudié dans le contexte du bourgeonnement de la membrane du TGN, et de ce fait, il est actuellement répertorié comme étant le lipide le plus important dans la formation des GSI. Différentes découvertes et affirmations appuient cette hypothèse. Tout d'abord, il a été mis en évidence que la membrane des GSCD des cellules corticotropes hypophysaires est riche en cholestérol (Dhanvantari and Loh, 2000). Par ailleurs, la membrane du TGN étant très riche en cholestérol, en glycosphingolipides et en sphingomyéline, il a été proposé que ces trois lipides soient regroupés dans des microdomaines (van Meer, 1998; Orci et al., 1981), à la façon de ceux décrits à la membrane plasmique et nommés « rafts lipidiques » **(Figure n°14).** Ces microdomaines, de par leur forte concentration en cholestérol, ont été proposés comme étant les sites de bourgeonnement des GSI au sein des cellules endocrines. Cette hypothèse fut appuyée par les découvertes

réalisées au sein des cellules AtT20, une lignée cellulaire hypophysaire. Au sein de ces cellules, lorsque le cholestérol est déplété en utilisant la méthyl-β-cyclodextrine, la formation des GSI est fortement altérée, entraînant l'accumulation des cœurs denses au sein du TGN. Par ailleurs, l'addition exogène de cholestérol dans ces cellules entraîne de nouveau la formation de GSI (Wang et al., 2000).

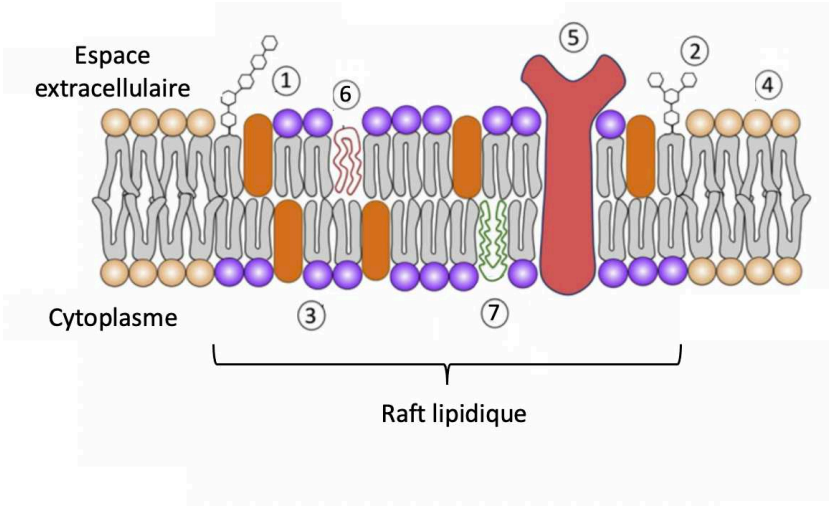


Figure n°14. Structure des rafts lipidiques identifiés au sein de la membrane plasmique. Les rafts lipidiques sont des microdomaines constitués de cholestérol (1), de glycosphingolipides (2), de phospholipides saturés (3), de sphingomyéline (4). Des protéines transmembranaires (5) ainsi que des protéines ancrées (6,7) sont également présentes au sein de ces rafts lipidiques. Adapté de Sebastião et al., 2013.

De manière intéressante, le cholestérol possède une structure particulière, conique, permettant d'induire des courbures négatives au niveau des membranes cellulaires, et ainsi la déformation membranaire (Bacia et al., 2005; Corda et al., 2002; Orci et al., 1980). De plus, il apparait que cet effet du cholestérol ne peut être substitué par d'autres stérols, tels que des précurseurs du cholestérol.

Par ailleurs, il existe des modèles murins de maladies génétiques humaines dans lesquels la synthèse de cholestérol est impactée suite à un défaut des enzymes de synthèse : mutation de *dhcr7* (7-Dehydrocholesterol Reductase) et de *sc5d* (Sterol-C5-Desaturase) mimant le syndrome de Smith-Lemli-Opitz et de lathostérolose, respectivement. Ces modèles murins présentent une diminution du nombre de GSCD au niveau des cellules endocrines du pancréas, de l'hypophyse et des glandes surrénales, accompagnée d'une malformation des GSCD des cellules exocrines du pancréas, qui semblerait dûe à une diminution de la courbure membranaire et à une augmentation de la rigidité membranaire *via* l'accumulation des précurseurs du cholestérol (Gondré-Lewis et al., 2006). D'après ces différentes études, il semble évident que le cholestérol exerce un rôle critique dans le bourgeonnement et la biogénèse des GSCD.

IV.3.2 Rôle des phosphoinositides

Les PI sont des lipides anioniques également décrits comme ayant un rôle important dans la formation des courbures membranaires (Rahajeng et al., 2019). Sous sa forme phosphorylée, le phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) a été montré comme étant impliqué dans le bourgeonnement des vésicules constitutives au niveau du TGN (Santiago-Tirado and Bretscher, 2011). Par ailleurs, il semblerait que le PI4P golgien puisse recruter FAPP1 et FAPP2 (Four-phosphate-adaptator protéine 1 et 2) qui lient ensuite la GTPase Arf1. Cette interaction entre le domaine PH (pleckstrin homology) des FAPPs, le PI4P et Arf1, serait impliquée dans la formation des vésicules et dans la régulation du transport de ces vésicules vers la membrane plasmique (Godi et al., 2004; Santiago-Tirado and Bretscher, 2011), laissant suggérer que le PI4P aurait aussi un rôle dans la régulation de la formation des vésicules de sécrétion, phénomène hautement régulé *in cellulo*. Qui plus est, il a été mis en évidence par l'équipe de Malhotra que la protéine Arfaptine 1, contenant un domaine BAR, située au niveau du réseau *trans*-golgien et impliquée dans la génération de courbures membranaires, interagit spécifiquement avec le PI4P. En effet, il semblerait que l'hélice α amphipathique qu'elle comporte, située en amont du domaine BAR, est essentielle pour sa liaison avec le PI4P. Cette liaison entre l'arfaptine 1 et le PI4P est dépendante de la phosphorylation induite par la protéine kinase D au niveau de la sérine 100 portée par l'hélice α de l'arfaptine 1. Au sein de cellules BON exprimant un siRNA dirigé contre arfaptine 1, il a été montré que cette liaison est nécessaire pour que la CgA soit sécrétée de façon régulée par ces cellules (Cruz-Garcia et al., 2013).

Par ailleurs, les PI kinases ont des localisations diverses dans le complexe golgien pour contrôler la production locale de PI4P, avec l'exemple de PI4KIIIβ qui est enrichie au niveau du *cis*-Golgi, tandis que PI4KIIα est localisée au niveau du TGN (Weixel et al., 2005). Cette régulation locale précise de la formation du PI4P serait un contrôle supplémentaire permettant une sélection précise *(i)* des protéines qui sont destinées à être sécrétées et *(ii)* de la voie qu'elles emprunteront afin d'être acheminées vers la membrane plasmique (Weixel et al., 2005). Ainsi, ces quelques éléments laissent suggérer que les PI seraient importants dans la formation des GSCD.

IV.3.3 Rôle de l'acide phosphatidique (PA)

Les fonctions pléiotropes du PA sont la conséquence directe de sa structure chimique très simple, constituée de deux chaînes acyles liées par des liaisons esters au glycérol, dont le groupe hydroxyle restant est estérifié par un groupe phosphomonoester **(Figure n°15).** Par conséquent, la petite tête phosphate du PA lui confère une structure conique générant de la

flexibilité, et l'accumulation de ce petit lipide conique dans un contexte de bicouche membranaire entraîne la formation de courbures négatives, propices au bourgeonnement de la membrane (Zegarlińska et al., 2018). Par ailleurs, il est intéressant de noter que plusieurs études ont montré que la courbure négative générée est plus prononcée à pH légèrement acide et en présence de cations divalents, tel que le Ca^{2+}, conditions régnant au sein du TGN (Farren et al., 1983; Kooijman et al., 2003; Verkleij et al., 1982).

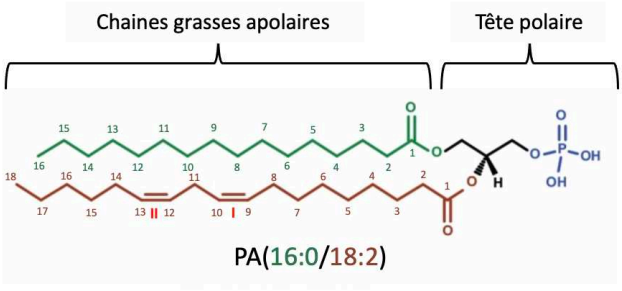


Figure n°15. Exemple de structure chimique de l'acide phosphatidique. Le glycérol (noir) du PA possède des acides gras estérifiés en position *sn-1* (comportant 16 carbones, notés de 1 à 16) et *sn-2* (comportant 18 carbones notés de 1 à 18, ainsi que deux insaturations notées I et II). La longueur des chaines carbonées est variable selon les espèces de PA. La tête phosphate est estérifiée en position *sn-3* par rapport au glycérol.

De plus, le groupe phosphomonoester chargé négativement du PA peut porter une ou deux charges négatives, selon le pH et les lipides environnants, et peut ainsi aider au recrutement de molécules chargées positivement au niveau des membranes biologiques enrichies en PA (Tanguy et al., 2018a). Ainsi, le PA remodèle les membranes cellulaires en changeant leurs propriétés physicochimiques lorsqu'il s'accumule localement, ce qui peut également modifier la fonctionnalité des protéines présentes dans cet environnement riche en PA (Jang et al., 2012; Yang et al., 2008).

IV.3.3.1 Voies de synthèse du PA

La synthèse de PA est réalisée selon plusieurs voies, chacune composée d'une cascade d'enzymes. En raison des différents substrats, de la localisation cellulaire et des voies métaboliques dans lesquelles ces enzymes sont impliquées, il est évident que les formes de PA synthétisées ne sont pas identiques en termes de structure, de comportement et d'impact sur les fonctions cellulaires (Zegarlińska et al., 2018).

À ce jour, il existe quatre voies principales permettant la production du PA dans les cellules de mammifères **(Figure n°16).**

En ce qui concerne le PA « structurel », il est synthétisé par le biais de deux réactions d'acylation menant à l'acide lysophosphatidique (LPA), une forme mono-acylée de PA : la voie du glycérol 3-phosphate (G-3-P) et la voie du dihydroxyacétone phosphate (DHAP). Le LPA est ensuite transformé en PA lors d'une deuxième étape d'acylation (Vance and Vance, 2004).

Le PA généré selon ces voies est un intermédiaire clé dans la synthèse de tous les triglycérides et glycérophospholipides, car il est rapidement converti par l'acide phosphatidique phosphohydrolase (PAP) en diacylglycérol (DAG), qui représente une source majeure pour la biosynthèse de ces lipides (Vance and Goldfine, 2002). De plus, le PA peut être dégradé par la CDP-DAG synthétase en CDP-DAG, qui est directement utilisé comme substrat pour la synthèse des phosphoinositides (PI), du phosphatidylglycérol (PG) et de la cardiolipine (CL). Enfin, les nombreuses isoformes de la phospholipase A (PLA) peuvent désacyler le PA en LPA (Zegarlińska et al., 2018).

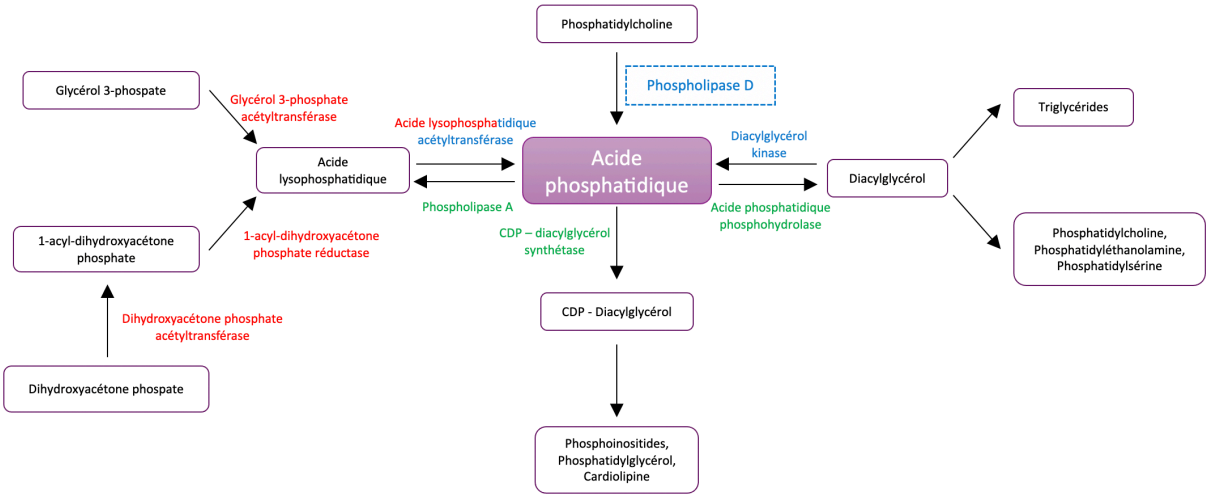


Figure n°16. Principales voies de synthèse du PA au sein des cellules mammaliennes. Le PA est un phospholipide central pour les réactions de biosynthèse et de signalisation. Les enzymes en rouge indiquent des réactions biosynthétiques qui conduisent à la synthèse du PA structural, tandis que les enzymes impliquées dans la formation du PA de signalisation sont en bleu. Notons que l'acide lysophosphatidique acétyltransférase est en rouge et bleu puisqu'il est impliqué dans ces deux voies. Les enzymes impliquées dans le catabolisme du PA sont quand à elles en vert.

En ce qui concerne le PA dit « de signalisation », il existe trois autres voies de biosynthèse utilisant des précurseurs lipidiques distincts *via* des enzymes qui appartiennent aux familles suivantes : la diacylglycérol kinase (DAG kinase), l'acide lysophosphatidique acétyltransférase (LPPAT) ou la phospholipase D (PLD) (Tanguy et al., 2018a).

La première voie implique la phosphorylation du DAG en utilisant l'ATP comme source de phosphate par la DAG kinase (DAG kinase). Dix isoformes (α, β, γ, δ, η, κ, ε, ξ, ι, et θ) de la DAG kinase ont été clonées, caractérisées et classées dans cinq sous-familles des DAG kinase partageant un domaine catalytique conservé et au moins 2 domaines riches en cystéines (Topham, 2006).

La deuxième voie implique l'acylation du LPA par des LPAAT spécifiques (Hollenback et al., 2006). Six isoformes humaines de LPAAT ont été clonées et caractérisées (Leung, 2001), mais seulement les isoformes α et β, partageant 34 % d'identité de séquence, se sont révélées avoir une activité LPAAT significative (Hollenback et al., 2006).

Par ailleurs, il existe d'autres protéines présentant des activités de type LPAAT qui ont été récemment identifiées. C'est le cas par exemple de la protéine RIBEYE dans le ruban synaptique, qui serait ainsi capable de produire le PA nécessaire pour une libération synaptique ultra-rapide (Schwarz et al., 2011).

La troisième et dernière voie implique la PLD, qui catalyse l'hydrolyse de la liaison phosphodiester distale présente dans la PC pour former du PA et de la choline. Six isoformes de PLD ont été identifiées grâce aux homologies de séquences, mais PLD1 et PLD2 sont les principales isoformes caractérisées, aucune activité directe de PLD n'ayant été démontrée à ce jour pour PLD3, PLD4 et PLD5 (Frohman, 2015).

En raison de la variété des substrats et des voies métaboliques décrites ci-dessus, des espèces de PA différentes de par la longueur et la saturation de leurs chaînes grasses peuvent être générées. Par exemple, l'hydrolyse du pool cellulaire de PC par la PLD entraîne de préférence la génération de PA contenant une chaîne acyle saturée et une chaîne acyle insaturée. Cette variabilité peut se révéler importante car elle peut être, au moins en partie, responsable des différences d'interaction entre les protéines et le PA, comme c'est le cas pour des protéines transmembranaires interagissant différemment avec des formes distinctes de sphingomyéline (Contreras et al., 2012; Zegarlińska et al., 2018).

Plus généralement, la complexité et la diversité des familles PLD, DAG kinase et LPAAT suggèrent qu'elles sont impliquées dans diverses fonctions cellulaires spécifiques qui ne sont probablement pas redondantes. En général, le PA « de signalisation » est impliqué dans différents types de fonctions cellulaires telles que l'organisation du cytosquelette, la survie, la prolifération cellulaire et le trafic membranaire/vésiculaire (Carman and Henry, 2007; Pleskot et al., 2013; Yang and Frohman, 2012). De manière intéressante, la conversion du PC en PA par la PLD transforme un phospholipide cylindrique en conique. De plus, grâce à des études de diffraction des rayons X, il a été démontré que l'accumulation de PA entraîne une courbure membranaire négative (Kooijman et al., 2005).

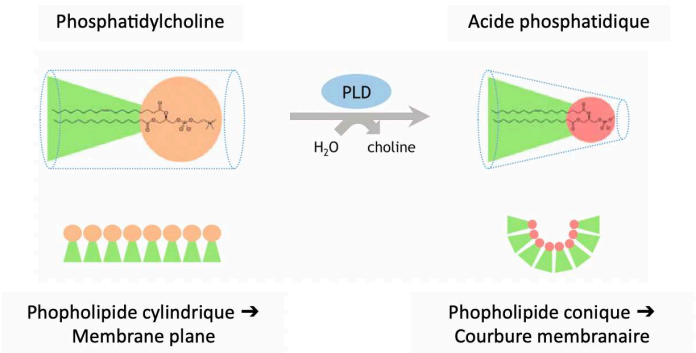


Figure n°17. Hydrolyse de la phosphatidylcholine par la PLD et modification de la géométrie lipidique. La PC cylindrique est hydrolysée en PA conique grâce à l'activité enzymatique portée par la PLD. L'accumulation du PA conique au niveau membranaire génère des régions à courbure négative, propices au bourgeonnement membranaire. Il est important de noter que le PA porte une ou deux charge(s) négative(s) en fonction du pH de son environnement. Adapté de Tanguy et al., 2018

Ces différentes éléments, en complément des modèles biophysiques qui ont été proposés, suggèrent un rôle direct du PA produit par la PLD en tant que lipide fusogénique (Vitale, 2010), ayant un rôle clé dans les phénomènes de courbure et de fusion membranaire **(Figure n°17).** Pour ces raisons, dans la suite de ce manuscrit, je me focaliserai sur le rôle du PA généré par la PLD dans la biogénèse des GSI et dans la voie de sécrétion régulée neuroendocrine de façon plus générale.

IV.3.3.2 Focalisation sur la phospholipase D (PLD)

IV.3.3.2.1 Identification

La PLD est une enzyme hydrolysant la liaison phosphodiester distale de la PC, un des principaux constituants des membranes cellulaires, pour produire du PA et de la choline. La PLD est considérée comme étant la principale source de PA dans les cellules (Frohman, 2015). Par ailleurs, nous nous intéressons plus particulièrement au PA produit par la PLD dans le contexte de la voie de sécrétion régulée du fait que cette réaction d'hydrolyse est capable de se dérouler en conditions physiologiques en réponse à des stimuli extracellulaires (Cazzolli et al., 2006).

L'activité de la PLD est présente dans différents types d'organismes (invertébrés, vertébrés, bactéries, champignons et végétaux), mais, à ce jour, la plupart des études sur les caractérisations de la fonction de la PLD ont été réalisées en utilisant des cellules mammaliennes. Ainsi, le clonage et la caractérisation des gènes codant pour les PLD ont permis d'identifier deux isoformes au sein des cellules animales : *PLD1* et *PLD2* **(Figure n°18).** Le premier gène humain codant la PLD1 a été caractérisé en 1995, grâce à son identification à partir d'un banque d'ADNc de cellules HeLa, par homologie de séquence avec le gène de la levure (Hammond et al., 1995). Ces travaux, réalisés par l'équipe de Frohman, ont montré que le gène de la PLD1 *(i)* code pour une protéine d'environ 120 kDa, et *(ii)* peut subir un épissage alternatif, afin de présenter deux variants : PLD1a et PLD1b. Ces deux variants ont les mêmes caractéristiques mais la séquence de PLD1b comporte une délétion de 38 acides aminés dans la région « boucle », dont la fonction n'est pas encore clairement établie (Hammond et al., 1997).

Suite à l'identification du gène *PLD1*, d'autres séquences homologues ont été identifiées chez les mammifères (Ribbes et al., 1996). Ainsi, *PLD2*, codant pour une protéine d'environ 100 kDa et présentant environ 50 % d'homologie de séquence avec PLD1 a été décrit par Colley et collaborateurs en 1997 (Colley et al., 1997). La PLD2 est dépourvue d'une boucle centrale de 116 acides aminés, pourtant présente au sein de la PLD1 et 3 variants d'épissage de la PLD2 humaine ont été mis en évidence : PLD2a (variant le plus long), PLD2b (variant plus court de 11 acides aminés) et PLD2c (variant tronqué ne possédant que les 335

premiers acides aminés de la séquence) (Steed et al., 1998). Les différents gènes codant pour les PLD ont cependant une caractéristique commune ; le centre catalytique est très conservé au cours de l'évolution, tandis que les régions N- et C-terminales ont des séquences qui sont beaucoup plus variables.

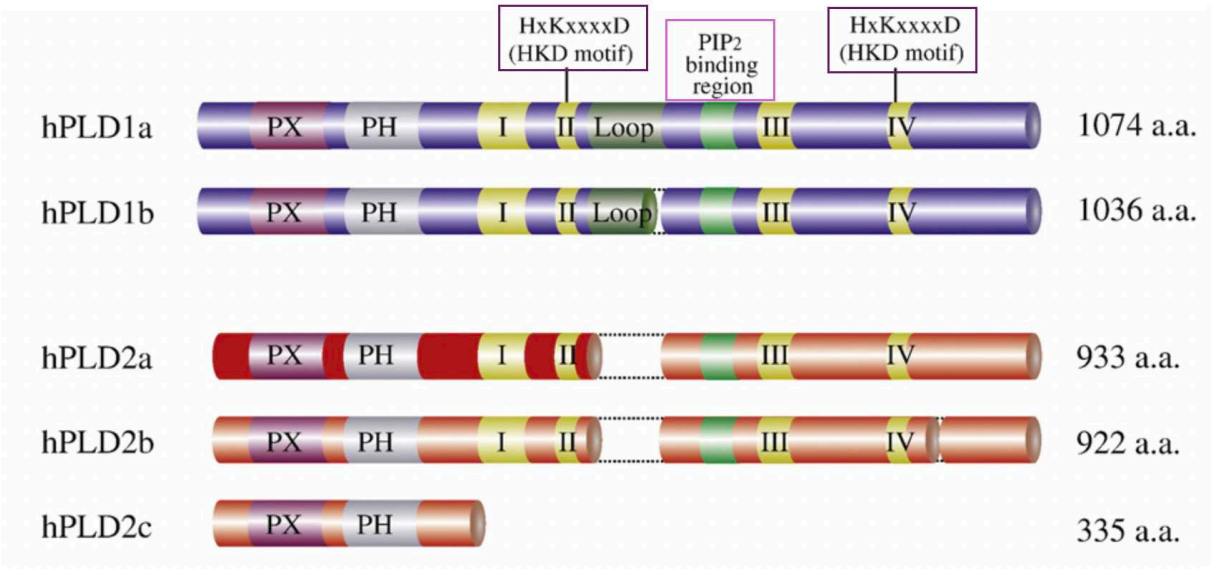


Figure n°18. Structure primaire et isoformes des phospholipases D1 (PLD1) et D2 (PLD2) humaines. Les quatre domaines catalytiques conservées au sein des PLD sont indiquées par des chiffres romains et les motifs « HKD » sont précisés dans les encadrés violet. Les domaines de liaison au PIP2 sont précisés dans les encadrés rose. Les domaines HKD maintiennent les interactions intra- et inter-moléculaires et sont essentiels pour le maintien de la catalyse. La PLD1 possède une région en boucle (Loop) faisant 116 résidus, localisée après le premier domaine HKD (absent de la PLD2), nommée « boucle d'activation » et impliquée dans la régulation de l'activité enzymatique. PLD1 et PLD2 peuvent subir un épissage alternatif. Par exemple pour PLD1, dans la plupart des cellules, une région de 33 résidus est éliminée de la boucle de PLD1a afin de produire PLD1b. De façon similaire, PLD2a est épissée afin de générer deux variants tronqués ; PLD2b et PLD2c. Abréviations : PH : domaine d'homologie à la pleckstrine, PX : domaine d'homologie à PHOX. Adapté de Kanaho et al., 2009.

Par ailleurs, chez les mammifères, PLD1 et PLD2 sont en association avec la face cytoplasmique des surfaces membranaires et sont responsables de l'hydrolyse de la phosphatidylcholine décrite ci-dessus (Peng and Frohman, 2012). PLD3 et PLD4, deux isoformes identifiées plus récemment (Osisami et al., 2012), sont des protéines transmembranaires ancrées *via* leur extrémité N-terminale à la membrane du RE. De ce fait, la majeure partie de la protéine, y compris les domaines catalytiques hypothétiques, est présente dans la lumière du RE. Quant à PLD6 (MitoPLD), elle est ancrée par son extrémité N-terminale à la surface externe des mitochondries, où elle hydrolyse la cardiolipine, un lipide spécifique des mitochondries, en PA (Choi et al., 2006). Enfin, PLD5 a une structure similaire à celle de PLD3 et PLD4 mais il est peu probable qu'elle ait une activité enzymatique car le motif catalytique enzymatique canonique des PLD n'est pas conservé (Frohman, 2015). Les

activités enzymatiques n'ont pas non plus été identifiées pour PLD3 ou PLD4, et il est possible qu'elles aient plutôt des fonctions non enzymatiques.

IV.3.3.2.2 Structure

Les gènes des PLD sont hautement structurés (Kanaho et al., 2009), et la structure des protéines PLD1 et PLD2 est bien connue **(Figure n°18) :**

- **Domaines catalytiques** : PLD1 et PLD2, à l'exception de PLD2c, possèdent quatre domaines catalytiques, notés CRI à CRIV, fortement conservés entre les espèces et les différentes isoformes. Les deux domaines CRII et CRIV sont plus précisément nommés « HKD » et sont caractérisés par la présence de résidus conservés : histidine (H), lysine (K) et acide aspartique (D), indispensables pour le fonctionnement de la PLD *in vivo* et pour la catalyse *in vitro* (Rizzo and Romero, 2002). De ce fait, chaque domaine HKD contient le motif HxKxxxxD/E, essentiel pour le maintien de la catalyse.
- **Domaines d'homologies à la pleckstrine** : une séquence formant un domaine d'homologie à la pleckstrine (domaine de type PH) a été identifié dans la partie N-terminale de PLD1 et PLD2. L'analyse des mutants délétés de la partie N-terminale de PLD1 et PLD2 a mis en évidence que le domaine PH n'est pas nécessaire à l'activité enzymatique, ni à la dépendance des PLD envers le PIP2 (Höer et al., 2000; Sung et al., 1999a, 1999b), et semblerait plutôt avoir un rôle dans la localisation subcellulaire de la protéine (Sciorra et al., 1999).
- **Domaines d'homologies à PHOX** : les domaines d'homologies à PHOX (domaines PX) sont également localisés dans la partie N-terminale des PLD. Il a été montré que ces domaines peuvent lier les PI ; PI3P, PI(3,4)P2, PI(4,5)P2, PI(3,5)P2 et PI(3,4,5)P3 (Xu et al., 2001). Il semblerait par ailleurs que ce domaine participe à l'auto-inhibition de la PLD1 (Sung et al., 1999b).
- **Domaines de liaisons au PIP2** : les activités des PLD1 et PLD2 sont très étroitement liées au PIP2, d'où la nécessité d'avoir une région spécialisée dans la liaison au PIP2 (en complément des domaines PX), située entre les deux domaines HKD. L'association du PIP2 avec ce domaine est fortement impliquée dans la catalyse de la PLD (Sciorra et al., 1999), suggérant que la liaison du PIP2 avec ce domaine est responsable de l'activation de l'enzyme.
- **Domaines N- et C-terminaux** : les séquences N-terminales des PLD semblent relativement peu conservées au cours de l'évolution et il a été mis en évidence par plusieurs auteurs que la partie N-terminale de la PLD1 contient une région d'interaction avec la protéine PKC, qui jouerait un rôle dans la régulation de l'activité enzymatique (Sung et al., 1999b; Xie et al., 1998). Les séquences C-terminales sont quant à elles

plutôt conservées au cours de l'évolution et elles sont indispensables à l'activité enzymatique des PLD (Sung et al., 1999b).

- **La boucle centrale de la PLD1** : la PLD1 possède en son centre une région de 100 à 150 acides aminés, entre les deux motifs HKD. Cette région est absente de la PLD2 et est impliquée dans les mécanismes d'auto-inhibition de l'enzyme, puisque sa délétion entraîne une augmentation de l'activité basale de l'enzyme (Sung et al., 1999b). C'est notamment pour cette raison que l'activité basale de PLD2, qui ne possède pas cette boucle centrale, est nettement plus élevée que celle de la PLD1 (Colley et al., 1997).

IV.3.3.2.3 Localisation subcellulaire

L'activité des PLD a été répertoriée comme étant liée à différents compartiments cellulaires, suite à des études d'immunocytochimie et de fractionnement subcellulaire. C'est notamment le cas de la membrane plasmique (Whatmore et al., 1996), de l'enveloppe nucléaire (Balboa and Insel, 1995), du RE (Decker et al., 1996), de l'appareil de Golgi et des vésicules de transport et de sécrétion (Liscovitch et al., 1999).

Lors d'études préliminaires s'intéressant plus précisément à la localisation subcellulaire de PLD1 et PLD2, il a été constaté que le PLD1 est localisée au niveau du RE, du complexe golgien, et des différents types de vésicules tandis que la PLD2 est plutôt localisée au niveau de la membrane plasmique au sein de fibroblastes embryonnaires murins (Colley et al., 1997). Lors d'une stimulation de ces cellules, la PLD2 semble être redistribuée au niveau de compartiments vésiculaires sous membranaires. Par ailleurs, dans des cellules COS7, il a été démontré que la PLD1 surexprimée est localisée au niveau d'endosomes périnucléaires et de l'appareil de Golgi et que, suite à une stimulation des cellules par un activateur des PKCs, la PLD1 est redistribuée à la membrane plasmique puis aux endosomes par un processus de transport membranaire.Il semble alors que le trafic de ces vésicules soit facilité par l'activité de la PLD1 (Du et al., 2003).

En ce qui concerne les membranes de l'appareil de Golgi, plusieurs études biochimiques ont fourni des preuves de la présence de la PLD (Ktistakis et al., 1995, 1996). De plus, la PLD1 et le PA résultant de son activité sont impliqués dans la formation des GSI à partir du TGN (Chen et al., 1997; Siddhanta and Shields, 1998). Malgré tout, Jones et collaborateurs (Jones et al., 2000) n'ont trouvé que des taux mineurs de PLD au niveau des membranes golgiennes suite à un fractionnement cellulaire. Ceci peut être en partie expliqué par le fait que différentes méthodes d'isolement des membranes golgiennes ont été utilisées (Chen et al., 1997; Jones et al., 2000; Ktistakis et al., 1995), rendant ainsi difficile la

comparaison directe des résultats obtenus dans les différentes études. De plus, la surexpression de PLD1-GFP ou PLD1-HA entraîne la localisation des construits dans plusieurs organites, tels que les endosomes, les lysosomes, les GSCD et la membrane plasmique, mais peu au niveau de l'appareil de Golgi (Brown et al., 1998; Kim et al., 1999). Pour résoudre ces problèmes, des techniques de microscopie électronique ont été utilisées pour localiser les PLD1 et PLD2 endogènes. Ainsi, la PLD1 présente une localisation golgienne et une distribution diffuse dans le cytoplasme (Freyberg et al., 2001a). Par ailleurs, la cryo – microscopie électronique combinée au fractionnement subcellulaire ont démontré que 25 à 30 % de la PLD1 endogène est localisée dans l'appareil de Golgi (Freyberg et al., 2003).

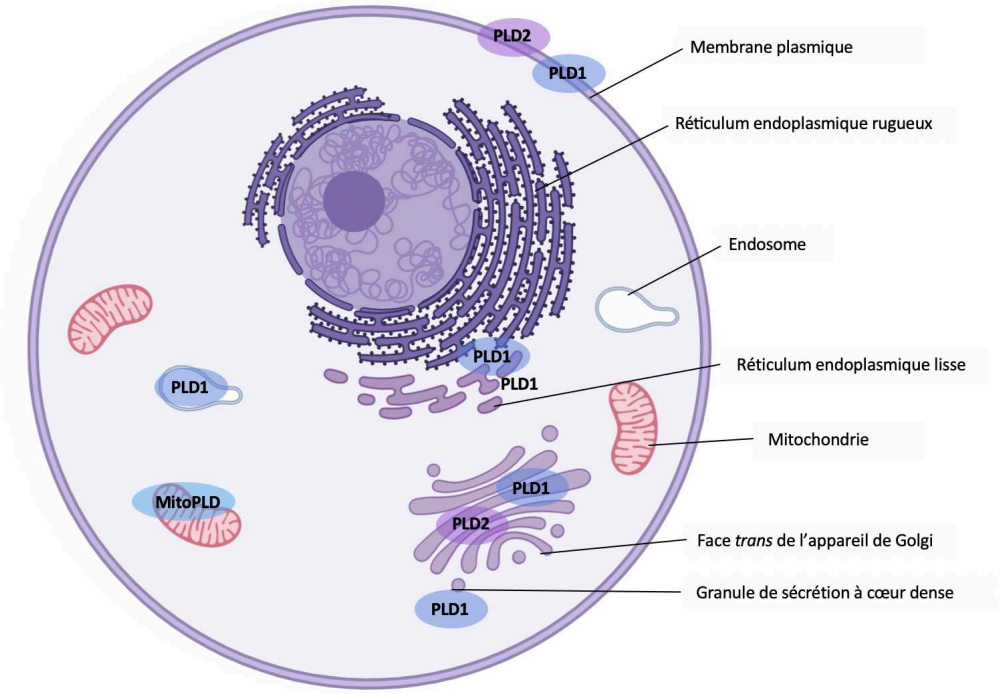


Figure n°19. Localisation subcellulaire des PLD1, PLD2 et mitoPLD (PLD6). La PLD1 est impliquée majoritairement dans l'hydrolyse de la phosphatidylcholine (PC) en acide phosphatidique (PA) au niveau de l'appareil de Golgi, des granules de sécrétion à cœur dense, des endosomes, de la membrane plasmique et du réticulum endoplasmique. La PLD2 est quant à elle impliquée dans l'hydrolyse de la PC en PA principalement au niveau de la membrane plasmique et de l'appareil de Golgi. La mitoPLD (PLD6) a une distribution spécifique de la membrane mitochondriale et est impliquée dans l'hydrolyse de la cardiolipine en PA.

En ce qui concerne la PLD2, sa surexpression entraîne sa localisation au niveau de la membrane plasmique (Colley et al., 1997; O'Luanaigh et al., 2002), en accord avec les études qui ont démontré une association entre la PLD2, ARF6 et le récepteur de l'EGF au niveau des protubérances membranaires dans les cellules HeLa (Honda et al., 1999). Bien qu'une partie de la PLD2 endogène soit présente au niveau de la membrane plasmique, une grande partie de l'enzyme est aussi localisée dans la région golgienne (Freyberg et al., 2002). L'ensemble de ces données sont schématiquement regroupées et illustrées en **Figure n°19.**

Ces résultats suggèrent la nécessité d'une interprétation prudente des données résultant d'une surexpression pour définir la localisation subcellulaire d'enzymes qui sont naturellement présentes en quantités catalytiques.

La distribution différentielle de PLD1 et PLD2 implique que ces enzymes ont des fonctions distinctes au niveau de l'appareil de Golgi, comme au sein des cellules. Comme expliqué plus haut dans ce paragraphe, la PLD2 a une activité basale relativement élevée, et de ce fait, elle pourrait fonctionner comme une enzyme « de maintenance » et maintenir un pool localisé de PA, tandis que la PLD1 pourrait jouer un rôle dans la modulation des niveaux de PA. En catalysant la formation de PA, les PLD pourraient modifier la composition de la membrane golgienne au niveau de sites spécifiques pour faciliter la formation des GSCD. En faveur de cette hypothèse, une étude a montré que l'augmentation des concentrations locales de PA, médiée par l'endophiline (protéine à domaine BAR exerçant une activité de type acyltransférase en utilisant comme substrats le LPA ainsi que des acides gras à longue chaîne carbonée), modifie suffisamment la courbure de la membrane pour faciliter le bourgeonnement des GSCD (Schmidt et al., 1999).

IV.3.3.3 Rôle du PA dérivé de l'activité de la PLD

L'impact du PA sur la courbure membranaire, nécessaire à la formation des GSCD, a été abordé dans le paragraphe ci-dessus. En résumé, le PA a une structure cylindrique à pH neutre mais il adopte une forme conique à pH acide et forte concentration calcique, conditions présentes au niveau du TGN (Kooijman et al., 2003) **(Figure n°17).** L'accumulation du PA avec cette structure conique entraînerait une courbure dite négative de la membrane du TGN, qui serait à l'origine de sa déstabilisation et contribuerait ainsi à la biogénèse des GSCD**.**

Par ailleurs, en plus de cet impact sur l'organisation des bicouches membranaires, la PLD et le PA semblent être nécessaires pour le recrutement des protéines du manteau (permettant la génération de vésicules coatées) ou d'autres constituants requis pour le bourgeonnement et la formation des vésicules (Roth, 1999). En effet la PLD et le PA sont impliqués dans le transport du RE vers l'AG (Bi et al., 1997) ou du TGN vers la membrane plasmique, supportant alors les phénomènes de sécrétion (Chen et al., 1997; Siddhanta and Shields, 1998). Par ailleurs, l'identification des GTPases ARF comme activatrices et stimulatrices de la PLD (Brown et al., 1993) a révélé le rôle que cette enzyme peut jouer comme médiateur des voies de sécrétion, en liaison avec le recrutement des complexes protéiques constituant le manteau des GSCD (Singer et al., 1997). De plus, les différentes

isoformes de la PLD1 sont présentes à la membrane des GSCD dans les cellules HL60 (Brown 1998) et au niveau des membranes du complexe golgien (Colley et al., 1997), laissant ainsi suggérer que l'activation de la PLD1 et son produit, le PA, semble jouer un rôle dans la biogénèse et le transport des vésicules en entrance ou partance du complexe golgien. En effet, les études réalisées sur la PLD dans différents types cellulaires ont démontré que le PA synthétisé à partir de la PLD est impliqué entre autres dans le transport golgien et dans l'exocytose (Choi et al., 2002; Jones et al., 1999).

Chen et collaborateurs en 1997, ont montré que l'addition de PLD1 purifiée entraîne le bourgeonnement des GSI à partir du TGN alors que l'ajout d'une PLD1 mutante purifiée l'inhibe (Chen et al., 1997). Par ailleurs, un traitement à l'éthanol, inhibant la production du PA empêche le recrutement des protéines COPI et la formation de vésicules coatées (Ktistakis et al., 1996). D'autres études réalisées par Yang et son équipe ont montré que la PLD2 est impliquée dans la fission et la formation des vésicules COPI au niveau du réseau *cis*-golgien (Yang et al., 2008). Dans ce contexte, Manifava et collaborateurs ont mis en évidence que plusieurs protéines impliquées dans le trafic vésiculaire (COPI, ARF, NSF et la kinésine) sont capables de lier le PA (Manifava et al., 2001).

En résumé, ces observations laissent supposer que l'activation de la PLD est un mécanisme important par lequel ARF peut intervenir dans le recrutement des protéines du manteau et ainsi permettre le coating des vésicules.

Ainsi, le PA, outre son implication dans la formation de courbure négative de la membrane du TGN menant au bourgeonnement des vésicules, est également présent à différents niveaux du complexe golgien afin de réguler la sécrétion cellulaire. Il reste maintenant à déterminer comment la localisation de la PLD et la production de PA sont contrôlés afin de continuer à disséquer ces mécanismes impliqués dans une multitude de processus cellulaires.

IV.4 Interaction entre l'acide phosphatidique et les protéines

Les protéines liées ou intégrées de façon transitoire au sein des membranes cellulaires régissent de nombreuses fonctions cellulaires vitales, telles que le transport de molécules ou d'organites, la signalisation et la réorganisation des membranes. Il semblerait que 40 % des protéines cellulaires soient en interaction avec les membranes cellulaires, indiquant ainsi les rôles clés des protéines sur les membranes biologiques (Arora and Tamm, 2001). La plupart des fonctions biologiques essentielles, telles que la signalisation et le transport subcellulaire, dépendent de ces protéines associées aux membranes de par leur capacité à se déplacer transitoirement à l'interface entre la lumière des organites ou le cytosol et les bicouches

lipidiques (Basso et al., 2016). Par ailleurs, il a été constaté que des interactions entre des protéines et des classes spécifiques de lipides peuvent moduler l'activité de certains canaux ioniques ou d'enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides (Basso et al., 2016; Raja et al., 2007).

Parmi les lipides membranaires, le PA est décrit dans la littérature comme cible de différentes catégories de protéines contribuant ainsi à la modulation de leurs activités catalytiques et à la régulation de leur association avec les membranes. En effet, le PA est capable d'interagir notamment avec les GTPases, les protéines de liaison aux nucléotides (GTP, ATP et AMPc), les kinases, les phosphatases ou les phospholipases (Ammar et al., 2013; Jang et al., 2012). Bien que des protéines liant le PA aient été découvertes et décrites, les propriétés spécifiques sous-jacentes à cette liaison sont encore mal comprises. Il semblerait cependant que la petite tête phosphomonoester spécifique au PA soit critique dans la liaison avec les protéines (Tanguy et al., 2018b), et certaines protéines possèdent en leur structure, des domaines d'interaction au PA (Stace and Ktistakis, 2006).

Dans cette section seront rapportés l'identification des domaines de liaison au PA (PA-binding domain ou PABD) au sein des protéines, ainsi que les différents paramètres biophysiques qui contribuent à une interaction protéine-PA efficace et sélective.

IV.4.1 Identification des domaines de liaison au PA au sein des protéines

En utilisant différents tests *in vitro*, il a été démontré que le PA interagit et/ou régule au moins 50 différents partenaires présents dans la plupart des organismes, allant des levures et plantes aux mammifères (Jang et al., 2012) **(Figure n°20).**

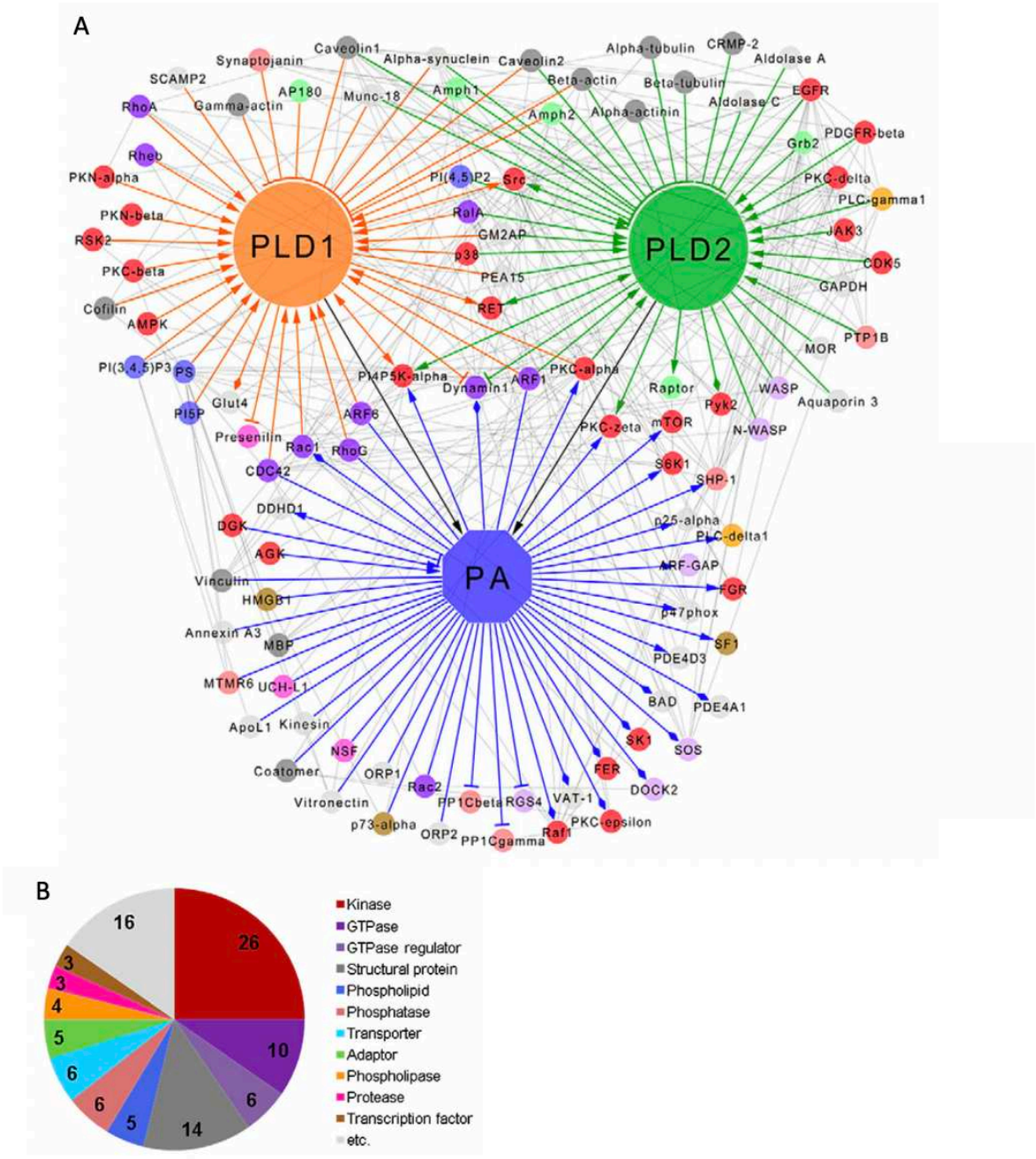


Figure n°20. Caractéristiques des partenaires liants le PA et les PLD. *(A)* Réseau d'interactions récapitulant les protéines capables de lier le PA et/ou les PLD. Les cercles de différentes couleurs (de grandes et petites tailles) représentent les PLD et le PA ainsi que leurs partenaires de liaison respectivement. La couleur des cercles de petite taille schématise la fonction moléculaire de chaque partenaire (voir partie B de la figure). Les lignes représentent les interactions et la couleur des lignes représente les types d'interaction (interactions avec PLD1, interactions avec PLD2, interactions avec le PA, réactions catalytiques avec les PLD, et interactions entre les partenaires de liaison). Les formes de la pointe des lignes représentent la relation entre les PLD et le PA avec leurs effecteurs (triangle : activation, barre : inhibition, diamant : translocation). *(B)* Fonctions moléculaires des partenaires de liaison des PLD et du PA. D'après Jang et al., 2012.

Concernant l'identification des PABD au sein de ces effecteurs, cela s'avère compliqué puisqu'il n'y a pas d'approches expérimentales permettant de savoir si les interactions protéine-lipide sont spécifiques au PA ou si elles reflètent d'une affinité globale pour les lipides chargés négativement. Néanmoins, une caractéristique majeure commune à la plupart des

PABD est la présence d'une courte séquence contenant des résidus chargés positivement (Jang et al., 2012). En accord avec cette découverte, il a été montré que des mutations ponctuelles au niveau des résidus basiques (chargés positivement) présents au sein des PABD entraîne une réduction de la liaison au PA (Stace and Ktistakis, 2006). Actuellement, une adaptation de ce modèle propose plutôt que les PABD doivent contenir une combinaison de résidus hydrophobes et de résidus chargés positivement exposés en surface de la protéine pour pouvoir interagir avec le PA. Il est également clair que la présence de certains acides aminés au niveau des PABD sont essentiels dans cette interaction. C'est notamment le cas de la lysine, de l'arginine et de l'histidine chargés positivement, et c'est aussi le cas, de la sérine et du tryptophane qui sont non-chargée et hydrophobe respectivement (Zegarlińska et al., 2018) **(Figure n°21).**

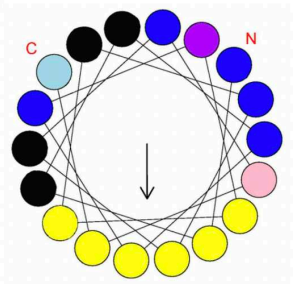


Figure n°21. Exemple de représentation d'un domaine de liaison à l'acide phosphatidique (PABD). Analyse *in sillico* d'une hélice α amphipathique identifiée au sein d'un PABD caractéristique, obtenue avec le logiciel Heliquest (http://heliquest.ipmc.cnrs.fr). La flèche indique le moment hydrophobe. Les acides aminés dont les radicaux sont basiques ou hydrophobes constituent majoritairement les PABD. Par ailleurs, certains acides aminés sont trouvés de façon prépondérante au sein de ces PABD tels que l'histidine, le tryptophane et la sérine. Les régions amino-terminale (N) et carboxy-terminale (C) du PABD sont indiquées. D'après Tanguy et al., 2018.

Depuis quelques années, des protéines de fusion ont été générées en surexprimant des protéines contenant un PABD fusionnées avec des protéines fluorescentes telle que la GFP afin de pouvoir suivre *in cellulo* la dynamique des pools de PA. Il a été observé que la surexpression de ces construits au sein des cellules entraîne une localisation diverse des construits, selon les PABD qui ont été générés. En effet, le PABD dérivant de la protéine de sporulation de levure Spo20p est principalement localisé au niveau du noyau et de la membrane plasmique (Kassas et al., 2012; Nakanishi et al., 2004), tandis que le PABD dérivant de la protéine de levure Opi1p fait la navette entre le réticulum endoplasmique et le noyau (Hofbauer et al., 2018; Loewen et al., 2004) et le PABD dérivant de la protéine mammalienne PDE4A1 est localisé au niveau de l'appareil de Golgi (Baillie et al., 2002). Des travaux récents ont exclu une expression dépendante des lignées cellulaires utilisées ou des interactions protéiques comme causes de cette localisation différentielle (Kassas et al., 2017).

Au contraire, il semblerait que ces différents PABD détectent différents pools de PA, dans un environnement spécifique (Kassas et al., 2017).

IV.4.2 Influence de la topologie et de l'environnement lipidique sur la liaison au PA

La composition lipidique et la structuration des membranes cellulaires influencent fortement la capacité des domaines PABD des protéines à lier le PA (Zegarlińska et al., 2018). Parmi les différents facteurs qui régissent les propriétés biophysiques des bicouches membranaires, la structure des membranes en termes de « condensation » de lipides est indispensable pour les interactions PA-protéine. En effet, la composition lipidique des membranes, ainsi que le degré d'insaturation des acides gras des phospholipides produisent des défauts géométriques au niveau de l'organisation des lipides, et il semblerait que la formation d'espaces entre les têtes polaires des lipides favorise la liaison de certaines protéines avec le PA (Tanguy et al., 2018b). Ainsi, il est proposé que de petites différences dans la forme globale des phospholipides causées par des acides gras insaturés en position *sn-2* pourraient créer des cavités de surface qui favoriseraient l'insertion de protéines présentant généralement une conformation hélicoïdale α (aspect détaillé ultérieurement dans ce paragraphe). Il est important de rappeler que la plupart, sinon la totalité, des PABD présentent une hélice α amphipathique avec des acides aminés chargés positivement d'un côté et des résidus hydrophobes de l'autre (Jang et al., 2012) **(Figure n°21).** Ces propositions sont confortées par une expérience reposant sur une mutation ponctuelle modifiant l'hélice α de Spo20p qui entraîne la réduction de sa liaison au PA (Nakanishi et al., 2004; Zeniou-Meyer et al., 2007a). En utilisant des expériences basées sur l'étude de l'interaction des PABD avec des liposomes enrichis en PA fluorescents, il a également été montré que les PABD de Opi1p, Spo20p et de PDE4A1 sont sensibles aux défauts de topologie membranaire, même si le PABD de Spo20p est généralement moins sensible (Kassas et al., 2017). Ainsi, il semble que lorsque les têtes polaires du PA sont plus disponibles et « libres » au sein des membranes, cela entraîne une augmentation de la liaison des PABD au PA. Par ailleurs, il a été constaté que la réduction du diamètre des liposomes, augmentant ainsi la courbure, favorise également la liaison des PABD au PA (Kassas et al., 2017; Putta et al., 2016). Ces conditions se rapprochent des différences spécifiques en termes de topologie et de courbure membranaires au sein des divers organites intracellulaires, et à la distribution subcellulaire spécifique de ces PABD au sein de protéines fusionnées à la GFP surexprimées.

En plus de la topologie membranaire impactant la liaison des PABD au PA, certains lipides, tels que la PE ou le cholestérol, jouent un rôle crucial dans la régulation de cette interaction.

La PE est un phospholipide contenant également une petite tête polaire, et de par sa structure, il est supposé diminuer l'encombrement stérique au niveau des bicouches lipidiques. Ainsi, au même titre que le PA, il est supposé faciliter les interactions entre les protéines et les membranes biologiques en permettant l'insertion des hélices amphipathiques au sein des phospholipides membranaires (McIntosh, 1996). Cependant, en plus de son faible impact au niveau de la topologie membranaire, la PE module également la charge des lipides membranaires contenant un phosphomonoester (cas du PA), selon le mécanisme de commutation de liaisons électrostatique-hydrogène, spécifique au PA. En effet, il a été montré que l'interaction du groupe de tête ester monophosphate du PA avec l'amine primaire au niveau de la tête polaire de la PE provoque une augmentation de la charge négative du phosphate porté par le PA (Kooijman et al., 2007; McIntosh, 1996). En résumé, la PE semble avoir deux effets distincts sur les membranes, qui pourraient influencer la liaison protéine-PA : *(i)* formation de courbure négative au niveau des bicouches membranaires de par sa forme et *(ii)* l'augmentation de la charge négative portée par le PA passant alors de −1 à −2 *via* le mécanisme de commutation de liaison électrostatique-hydrogène **(Figure n°22).**

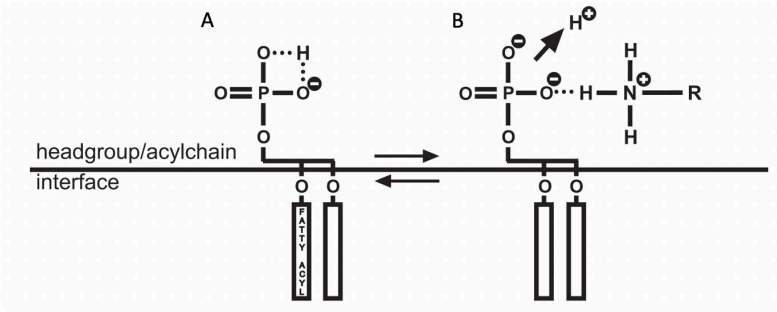


Figure n°22. Modèle de commutation de liaison électrostatique-hydrogène permettant l'augmentation des charges négatives portées par le PA. *(A)* Le groupe de tête phosphomonoester du PA forme une liaison hydrogène intramoléculaire lors de la déprotonation initiale (lorsque sa charge est ≥ 1). *(B)* Par contre, lorsque des liaisons hydrogènes concurrentes sont présentes, par exemple : présence de l'amine primaire du groupe de tête de la PE, présence de lysines (cas de cet exemple) ou d'arginines, cela peut déstabiliser cette liaison hydrogène intramoléculaire et, ainsi, favoriser la déprotonation supplémentaire du PA, entrainant une augmentation des charges négatives portées par le PA et renforçant ainsi l'interaction avec les PABD présents au sein des protéines. Les interactions intra- et inter-moléculaires des liaisons hydrogène sont indiquées par une ligne en pointillés. D'après Kooijman et al., 2007.

La modification des niveaux de cholestérol est une autre façon de moduler la topologie des membranes. En effet, il a été constaté par l'équipe du Dr. Nicolas Vitale que des niveaux plus élevés de cholestérol améliorent la liaison des liposomes contenant du PA au PABD de Spo20p alors que cela n'a pas d'impact notable sur la liaison du PABD de PDE4A1 (Kassas

et al., 2017) **(Figure n°23)**. L'ensemble de ces résultats indique que la topologie locale de la membrane a un effet important sur la liaison entre le PA et les protéines, et en outre que les PABD présents au sein des protéines possèdent une sensibilité différentielle.

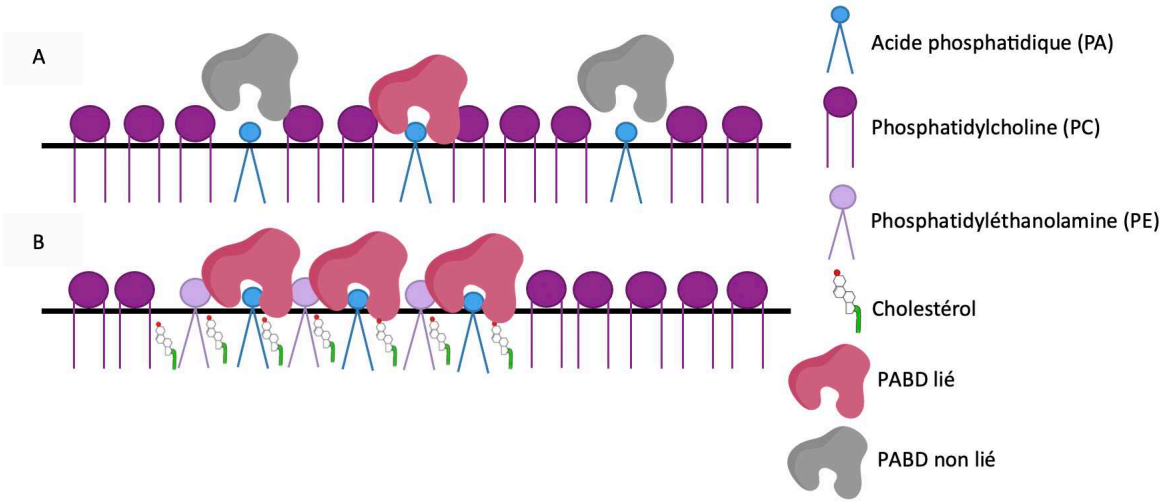


Figure n°23. Impact de la phosphatidyléthanolamine (PE) et du cholestérol dans la liaison des protéines présentant un PABD au PA. *(A)* Lorsque les domaines membranaires sont uniquement enrichis en PC (ou en lipides ayant une structure similaire au PC), l'encombrement stérique autour des PA est trop important, les domaines sont trop condensés et dans cette configuration, les PABD ne sont pas enclins à interagir avec les PA. *(B)* Lorsque les domaines membranaires contiennent du PC mais sont également enrichis en cholestérol, en PE et/ou en phospholipides insaturés, cela entraine la formation de cavités de surface, la tête polaire des PA est plus accessible, facilitant ainsi l'interaction entre les PABD et les PA. Bien que non-représentés dans ce schéma, la courbure membranaire, le pH et le calcium sont également des facteurs clés régissant l'interaction entre PA et PABD.

IV.4.3 Influence des charges portées par les membranes, du pH et des concentrations calciques sur la liaison au PA

L'un des facteurs déterminants dans la structure et la fonction des membranes cellulaires est la présence de lipides portant des charges négatives. En effet, ces charges négatives portées par les lipides anioniques représentent des sites critiques dans l'attraction et l'interaction avec des protéines contenant des acides aminés basiques (chargés positivement) (Zegarlińska et al., 2018). Or, certains PABD contenant des acides aminés basiques lient des PA portant plusieurs charges négatives, et plus le nombre de ces charges négatives augmente en fonction des paramètres environnementaux, plus l'interaction entre la protéine et le PA est forte. De plus, il semblerait que l'apport de charges négatives par d'autres phospholipides membranaires environnants favoriserait les interactions entre le PA et les protéines (Tanguy et al., 2018b). Dans l'objectif de tester directement l'action de la charge nette sur la capacité des différents PABD à lier le PA, des quantités croissantes de PS (phospholipide chargé négativement) peuvent être ajoutées lors des expériences de liaison des PABD avec les liposomes enrichis en PA. Ainsi, les liposomes enrichis en PA et en PS

possèdent une augmentation du taux de charges négatives entrainant une augmentation de la liaison des PABD de Spo20p (Horchani et al., 2014; Kassas et al., 2017) et de PDE4A1 (Kassas et al., 2017), sans modification significative de la liaison du PABD de Opi1p (Kassas et al., 2017), révélant une fois de plus que les PABD n'ont pas la même sensibilité vis-à-vis de l'environnement membranaire.

En outre, les ions divalents tels que le calcium peuvent également interagir de manière électrostatique avec les charges négatives portées par le PA, et par conséquent, impacter directement la quantité de charges négatives disponibles pour l'interaction entre PABD et PA. Il est également important de noter que la liaison du calcium au PA est pH-dépendante. En effet, à pH physiologique ou acide, le PA porte une seule charge négative et ainsi, un ion calcium lie deux molécules de PA, tandis que lorsque le PA porte deux charges négatives à pH plus élevé (pH $\cong$ 11), un ion calcium ne lie qu'une molécule de PA (rapport de 1 pour 1) (Boughriet et al., 1988; Kooijman et al., 2003; Takahashi et al., 1995). Par ailleurs, d'autres études basées sur l'utilisation de la calorimétrie différentielle à balayage et la diffraction des rayons X pour analyser des agrégats composés de deux espèces de PA saturées, le di-myristoyl PA (DMPA) et le di-palmitoyl PA (DPPA), ont montré que lorsque des ions calcium sont présents (au pH physiologique), aucune transition de phase cristalline gel-à-liquide n'a été observée à une température allant de 10°C à 80°C (van Dijck et al., 1978; Liao and Prestegard, 1981). D'autre part, ces facteurs (ions calcium et fluctuations du pH) n'affectent pas indépendamment la courbure des membranes contenant du PA, mais c'est la combinaison de concentration calcique et pH acide qui entraîne le PA à un tel comportement (Kooijman et al., 2003). Ces résultats montrent qu'en présence de calcium et dans un environnement légèrement acide, le PA se comporte comme un lipide en forme de cône. Par conséquent, on peut supposer que les transitions de géométrie du PA seraient plus probables dans un environnement intra-golgien, plutôt que dans des conditions cytosoliques, et ainsi, que les liaisons PA-protéines seraient privilégiées par les conditions physico-chimiques particulières du compartiment golgien.

Par ailleurs, il a été mis en évidence que des concentrations millimolaires de calcium libre, telles que celles rencontrées dans le TGN et les GSCD (~15 mM), augmentent la liaison des PABD de Spo20p et de PDE4A1 aux liposomes contenant du PA, alors qu'à des concentrations cytosoliques (~100 nM), le calcium n'a pas d'impact sur la liaison du PA au PABD de Opi1p (Kassas et al., 2017), en accord avec les différences de sensibilité calcique entre les différents PABD.

En résumé, l'augmentation de la concentration calcique au sein d'un environnement au pH légèrement acide favorise l'attraction électrostatique entre les acides aminés chargés positivement au sein du PABD et le PA, renforçant alors la liaison. En accord avec ce modèle, les analyses *in silico* ont révélé que le mécanisme de commutation de liaison électrostatique-hydrogène décrit précédemment intensifie également notablement l'affinité des PABD riches en lysines et/ou arginines pour le PA (Kooijman et al., 2007; Loew et al., 2013).

IV.4.4 Influence du mécanisme de commutation de liaison électrostatique-hydrogène et du pH sur la liaison au PA

Lorsque l'on s'intéresse à un modèle de bicouche membranaire constitué majoritairement de PC et minoritairement de PA (afin de refléter *in vitro* ce qui se passe *in cellulo*, où les quantités de PA membranaires sont variables selon les organites et de l'ordre de 1 %), il a été constaté que le degré de déprotonation du PA *via* le mécanisme de commutation de liaison électrostatique-hydrogène est modifié lors de la liaison des PABD des protéines, améliorant ainsi cette interaction sans nécessité d'énergie supplémentaire. Ce mécanisme bien connu est directement affecté par les modifications de pH intracellulaire (Loew et al., 2013). En effet, l'affinité des PABD pour le PA peut chuter considérablement après une diminution physiologique du pH. Ces constatations ont permis à l'équipe du Pr. May de postuler que ce mécanisme de déprotonation du PA permet également aux protéines de différencier le PA au sein d'une bicouche membranaire contenant des quantités plus élevées d'un autre lipide chargé négativement, le PS, qui ne possède pas cette propriété particulière (Loew et al., 2013). En accord avec ces travaux, le groupe du Pr. Loewen a montré que Opi1p régule sa liaison au PA de manière sensible au pH en fonction du métabolisme général de la levure, ce qui impacte la biogénèse membranaire (Young et al., 2010). En effet, la diminution des ressources alimentaires induit une baisse du pH cytosolique au sein des levures et, par conséquent, Opi1p est libéré de la membrane du RE et fait la navette vers le noyau où il module l'expression des gènes, conduisant à l'arrêt de la biogenèse membranaire. Inversement, dans des conditions de croissance normale où le pH est neutre, Opi1p est restreint à la membrane du RE *via* son interaction avec le PA, permettant la biogenèse membranaire. Ainsi, l'épuisement des nutriments arrête efficacement la croissance grâce à un processus qui implique le recrutement d'Opi1p au niveau du noyau lorsque son interaction avec le PA n'est plus possible. A l'heure actuelle, il n'y a pas d'homologue d'Opi1p identifié chez les mammifères, et on ne sait pas si cette régulation pH dépendante de la liaison protéine-PA se produit pour d'autres effecteurs du PA. Cependant, la résonance magnétique nucléaire et les simulations de dynamique moléculaire ont révélé que le PABD de la protéine Dvl (Disheveled) se lie au PA de manière sensible au pH, modulant ainsi sa capacité à interagir

avec le récepteur Frizzled situé au niveau de la membrane plasmique et régulant de ce fait les voies de signalisation Wnt (Capelluto et al., 2014).

IV.4.5 Influence des insaturations du PA sur la liaison avec les PABD

Les analyses réalisées par spectrométrie de masse ont montré que plus de 40 espèces de PA différentes existent dans un type cellulaire précis (Andreyev et al., 2010; Kassas et al., 2017), ce qui suggère que ces différentes espèces de PA possèdent des rôles biologiques différents. Ainsi, on peut postuler que ces espèces de PA présenteraient une affinité particulière pour les protéines possédant un PABD. Cette hypothèse est étayée par une étude qui a montré, à l'aide de liposomes enrichis avec différentes espèces de PA, que les protéines Spo20p, Opi1p et PDE4A1 possédant un PABD présentent une préférence globale pour les acides gras longs et insaturés (Kassas et al., 2017). Ces préférences pourraient reposer sur la composition variable en résidus hydrophobes, de cinq à sept, au niveau de la face hydrophobe des trois protéines testées. Le nombre de charges positives varie également entre les PABD, suggérant que le nombre de molécules de PA interagissant avec les PABD est variable (Potocký et al., 2014; Tanguy et al., 2018b). Enfin, certaines protéines interagiraient directement et spécifiquement avec les chaines d'acides gras portées par les espèces de PA. C'est notamment le cas du PABD de la GTPase Drp1 (Dynamin-related protein 1) qui présente une préférence nette pour des PA à chaines d'acides gras saturés (Adachi et al., 2016, 2018).

En résumé, depuis le début des années 2000, les mécanismes régulant l'interaction entre le PA et les PABD présents au sein des protéines sont étroitement étudiés afin d'élucider les rôles clés portés par ce petit lipide ayant une géométrie et des caractéristiques qui lui sont propres. La littérature récente, basée sur des preuves expérimentales et informatiques, soutient que la commutation de liaison électrostatique–hydrogène au niveau de la tête phosphate de PA associée au positionnement du phosphate à proximité immédiate de l'intérieur hydrophobe de la membrane confère des propriétés uniques au PA, en comparaison avec d'autres lipides membranaires anioniques. Par ailleurs, les données disponibles suggèrent que la formation de courbure membranaire, la composition lipidique locale de la membrane, ainsi que les propriétés biophysiques particulières du PA, sont des facteurs importants régulant la liaison au PABD.

V. Couplage exocytose–endocytose dans les cellules neuroendocrines

Au sein de cellules excitables, telles que les neurones et les cellules neuroendocrines, l'exocytose régulée se déroule quelques secondes après la dépolarisation membranaire. Lors d'une stimulation forte, une très courte période suffit pour qu'une fusion massive des GSCD avec la membrane plasmique ait lieu au niveau de sites membranaires spécifiques. Suite à ce processus hautement régulé et dépendant du calcium, une endocytose compensatrice va permettre de recycler les constituants vésiculaires et ainsi, « nettoyer » les sites exocytiques au niveau de la membrane plasmique (Liang et al., 2017). En prenant en compte la cinétique et les molécules impliquées au sein de différents types cellulaires, une variété de sous-types d'exocytose et d'endocytose compensatrice ont été décrits.

L'exocytose est permise suite à la fusion de la membrane des GSCD avec la membrane plasmique. La fusion entre les deux compartiments membranaires a lieu suite à la diminution de la force de répulsion électrostatique entre les deux membranes et à la formation d'un complexe SNARE fournissant l'énergie requise. Ensuite, selon le destin des constituants granulaires, l'exocytose peut prendre différentes formes : ***full fusion***, lors de laquelle la portion de membrane granulaire s'insère au sein de la membrane plasmique (**Figure n°24, A**), ou ***kiss-and-run***, lors de laquelle la fusion de la membrane granulaire avec la membrane plasmique est brève, *via* la formation d'un pore de fusion transitoire (**Figure n°24, B**). Ce dernier mode de fusion permet la libération d'une portion du contenu granulaire, et notamment une libération sélective des molécules de petite taille telles que les catécholamines en ce qui concerne les cellules chromaffines ou neuronales (Alabi and Tsien, 2013; An and Zenisek, 2004; Rizzoli and Jahn, 2007). Ces deux mécanismes ont été détaillés plus haut dans ce manuscrit.

Ces deux types d'exocytose sont couplés finement avec une endocytose compensatrice **(Figure n°24, C)** qui se met en place rapidement afin de maintenir la surface membranaire et permettre le recyclage des protéines transmembranaires et des lipides présents au niveau de la membrane des GSCD (Liang et al., 2017)**.** Ce couplage exocytose régulée – endocytose compensatrice est présent notamment dans les cellules chromaffines. En effet, dans ces cellules, la surexpression de protéines membranaires granulaires (VMAT2 ou dopamine-β-hydroxylase (DBH)) couplées à une molécule détectable telle que la GFP a montré que, suite au mécanisme de *full fusion*, les protéines de fusion fluorescentes sont

localisées et insérées sous forme de clusters au niveau de la membrane plasmique, afin de permettre la mise en place de leur recyclage *via* une voie d'endocytose clathrine – dépendante (Bittner et al., 2013; Ceridono et al., 2011).

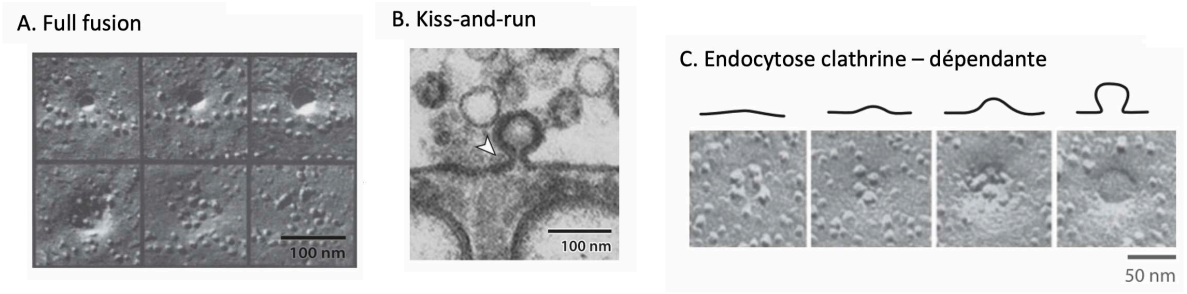


Figure n°24. Observation en microscopie électronique de l'exocytose full fusion *(A)*, kiss-and-run *(B)* et d'une endocytose clathrine – dépendante *(C)*. *(A)* Séquence d'images obtenues en microscopie électronique à balayage montrant l'exocytose full-fusion en suivant cet ordre : du coin supérieur gauche au coin supérieur droit puis du coin inférieur gauche au coin inférieur droit. Ces images ont été prises au niveau de jonctions neuromusculaires de grenouille, congelées à différents temps après stimulation (de 3,7 ms, 5,2 ms, 5,2 ms à 50 ms). *(B)* Image obtenue en microscopie électronique à transmission d'un granule de sécrétion candidat (pointe de flèche) à la fusion par kiss-and-run, au niveau d'une jonction neuromusculaire de grenouille stimulée pendant 2 heures en présence de peroxydase de raifort. *(C)* Séquence d'images obtenues en microscopie électronique à balayage montrant l'endocytose clathrine – dépendante en suivant cet ordre : de gauche à droite. Les images ont été prises au niveau de jonctions neuromusculaires de grenouille, congelées à différents temps. Adapté de Wu et al., 2014.

Au regard de la cinétique, l'endocytose compensatrice est divisée en deux catégories : une endocytose rapide et une endocytose plus lente (Artalejo et al., 2002; He et al., 2008; Lou et al., 2008; Wu et al., 2009). Dans la littérature, l'endocytose rapide est décrite comme étant clathrine-indépendante alors que l'endocytose plus lente semblerait être, quant à elle, clathrine-dépendante (He et al., 2008; Lou et al., 2008). Sur la base de ces caractéristiques cinétiques et mécanistiques, la *full fusion* d'un GSCD avec la membrane plasmique serait suivie par une endocytose « lente », clathrine – dépendante, tandis que l'endocytose suivant un mécanisme de *kiss-and-run* serait « rapide » et clathrine – indépendante **(Figure n°25).**

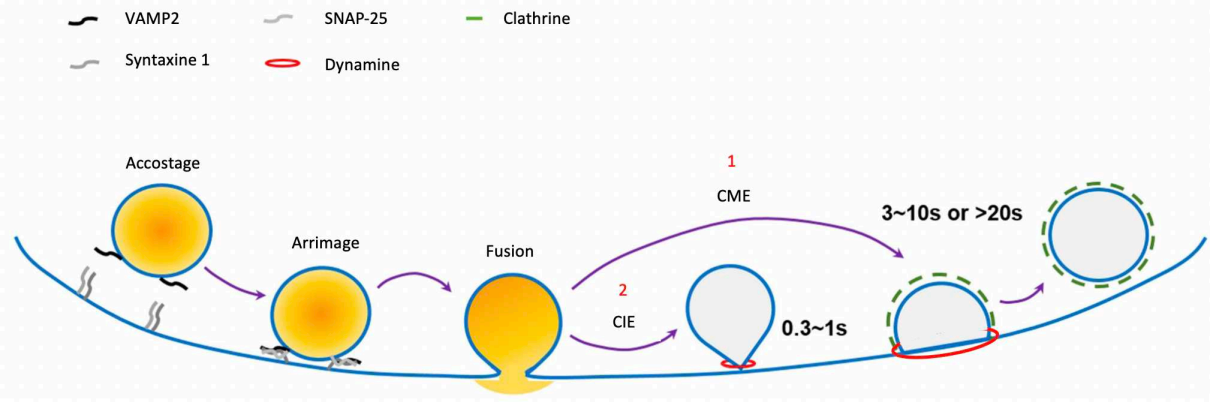


Figure n°25. Différentes étapes du couplage exocytose régulée – endocytose compensatrice. Suite à l'accostage et à l'arrimage du GSCD avec la membrane plasmique, celui-ci fusionne avec la membrane plasmique, selon deux modes : *(1)* Le GSCD fusionne complétement, et dans ce cas, la membrane granulaire est incorporée à la membrane plasmique. L'endocytose qui se déroule suite à ce type de fusion est une endocytose lente, clathrine – dépendante (CME) ; *(2)* le GSCD fusionne avec la membrane plasmique *via* un pore de fusion transitoire et dans ce cas, l'endocytose compensatrice qui se mettra en place sera rapide, clathrine – indépendante (CIE). Adapté de Liang et al., 2017.

V.1 Différentes formes d'endocytose compensatrice

V.1.1 Endocytose dépendante de la clathrine

En utilisant des techniques d'immunomarquage couplé à la microscopie confocale, les zones d'activités synaptiques se sont avérées entourées d'une zone « péri-active » enrichie en protéines endocytaires telles que la clathrine et la dynamine, qui permettraient la mise en place de l'endocytose médiée par la clathrine suite à la transmission synaptique (Cano and Tabares, 2016). Quant aux cellules chromaffines, l'équipe du Dr Gasman a mis en évidence que la dopamine-β-hydroxylase reste, avec d'autres constituants de la membrane granulaire, à la membrane plasmique sous forme de clusters suite à la fusion complète d'un GSCD. Ces clusters peuvent ensuite être internalisés de manière clathrine et actine dépendante dans des structures vésiculaires composées de la plupart de ces constituants granulaires (Ceridono et al., 2011). Concernant le devenir de ces clusters internalisés *in cellulo*, ils seront de nouveau adressés à la membrane plasmique lors de l'exocytose au sein de cellules chromaffines murines (Fulop et al., 2005). L'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre les protéines de la membrane du GSCD au sein de cellules chromaffines a révélé que la membrane internalisée *via* une endocytose clathrine-dépendante est retrouvée au niveau des lysosomes après des périodes de plus de 30 minutes (Benedeczky and Somogyi, 1978; Patzak et al., 1987; Phillips et al., 1983). De plus, Patzak et Winkler (1986) ont décrit que 30 min après stimulation, une partie du marquage est présent au niveau de la région golgienne, et après 6 heures, il a finalement été retrouvé dans des vésicules indiscernables des GSCD (Patzak and

Winkler, 1986). Ces résultats suggèrent qu'après une endocytose médiée par la clathrine, de nouveaux GSCD sont néosynthétisés à partir du complexe golgien en recyclant les composés granulaires provenant de l'endocytose afin de maintenir un niveau constant de GSCD.

L'utilisation de la microscopie à ondes évanescentes ou TIRFM a révélé que l'exocytose au sein de cellules MIN6 (lignée cellulaire dérivant de cellules β sécrétant de l'insuline) est associée au recrutement de la dynamine mais pas de la clathrine, ni de l'epsine ou de l'amphiphysine (protéines adaptatrices permettant la liaison de la clathrine). Cette étude a permis de mettre en évidence que seule l'exocytose transitoire (*kiss-and-run*) spatialement couplée à l'endocytose indépendante de la clathrine est présente dans ces cellules (Tsuboi et al., 2004). Cependant, malgré ces constatations, plusieurs questions restent inexplorées : le recrutement de dynamine au niveau des sites d'exocytose est-elle à l'origine d'une véritable endocytose ? Si cela correspond bien à une endocytose indépendante de la clathrine, la cinétique correspond-elle aux données électrophysiologiques ? Quelle est la signification physiologique ? Récemment, le couplage exocytose – endocytose a de nouveau été étudié, permettant de mettre en évidence que la clathrine est recrutée au niveau des sites d'exocytose de manière rapide ou lente, et que ce recrutement est accompagné par celui de la dynamine (Yuan et al., 2015). Le recrutement lent représente une formation *de novo* de puits recouverts de clathrine (PRC) alors que le recrutement rapide est possible grâce à des PRC déjà présents au niveau de la membrane ou au déplacement rapide des PRC présents à proximité du site de fusion, en suivant le gradient de DAG généré lors de l'exocytose. Par ailleurs, le recrutement des PRC au niveau du site d'exocytose permet l'endocytose de protéines vésiculaires telles que la synaptotagmine VII ou la synaptobrévine 2 (VAMP2) (Yuan et al., 2015). Par conséquent, l'endocytose dépendante de la clathrine semblerait pouvoir se dérouler lentement mais aussi rapidement, et ces données corroborent celles provenant d'études réalisées sur des neurones hippocampaux (Granseth et al., 2006; Zhu et al., 2009).

Ainsi, les premières études révélaient que la vitesse et la nature de l'endocytose dépendaient de l'ampleur de la force de stimulation, mais cela ne serait pas le seul critère distinguant l'endocytose dépendante de la clathrine de l'endocytose indépendante de la clathrine. Récemment, il a été montré qu'une endocytose rapide dépendante de la clathrine est également importante suite à une exocytose soutenue lors une stimulation intense (Yuan et al., 2015).

V.1.2 Endocytose indépendante de la clathrine

Le recrutement de la dynamine au niveau des sites d'exocytose environ 2 secondes après un événement de fusion peut être séquencé en trois fonctions gaussiennes **(Figure n°26)** (Liang et al., 2017). Alors que les deux dernières fonctions gaussiennes correspondent à l'endocytose dépendante de la dynamine et de la clathrine, la première représente le recrutement de la dynamine indépendant de la clathrine **(Figure n°26).**

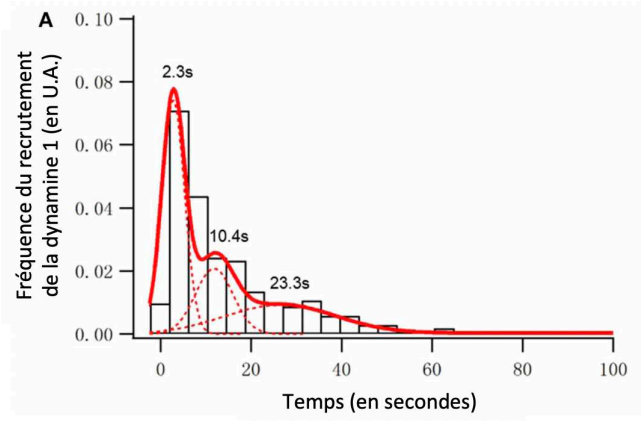


Figure n°26. Décroissance de la capacité membranaire au niveau d'un site de fusion en raison de l'endocytose clathrine dépendante ou indépendante. Histogramme normalisé du recrutement de la dynamine 1 au niveau des sites de fusion. Le recrutement de la dynamine 1 peut être représentée par trois distributions gaussiennes : 2,3 ± 0,11, 10,4 ± 0,5 et 23,3 ± 3,7 secondes. Les deux dernières populations sont dépendantes de la clathrine, tandis que la première est indépendante de la clathrine. D'après He et al., 2008.

Par ailleurs, en supposant que l'endocytose indépendante de la clathrine soit capable de recycler un GSCD d'environ 200 nm de diamètre, la taille de la portion membranaire internalisée doit être beaucoup plus grande que celle internalisée par la voie rapide dépendante de la clathrine, en accord avec des expériences de capacité membranaire menées dans des cellules β pancréatiques de rat (He et al., 2008). En effet, il a été démontré que l'endocytose clathrine-dépendante d'une portion membranaire correspondant à la fusion d'un GSCD de 200 nm environ se faisait « partie par partie », permettant ainsi à la clathrine et à la dynamine d'internaliser les constituants de la membrane granulaire sous forme de portions de membrane recouvertes de clathrine faisant environ 90 nm **(Figure n°27)** (Bittner et al., 2013).

De ce fait, pour l'endocytose indépendante de la clathrine, il semble nécessaire que d'autres constituants, en plus de la dynamine, soient requis pour permettre l'internalisation de ces grandes portions membranaires. Au sein des cellules β pancréatiques, il a été mis en évidence que l'actine joue également un rôle indispensable dans l'endocytose indépendante de la clathrine (He et al., 2008). Le rôle de l'actine pour l'endocytose rapide indépendante de

la clathrine a également été décrit dans les neurones (Delvendahl et al., 2016; Soykan et al., 2017; Wu et al., 2016)

Au niveau physiologique, ce recrutement rapide de dynamine indépendant de la clathrine contribue à la décroissance rapide de la capacité membranaire enregistrée dans les cellules endocrines et dans les synapses (Artalejo et al., 2002; Hosoi et al., 2009; Lou et al., 2008).

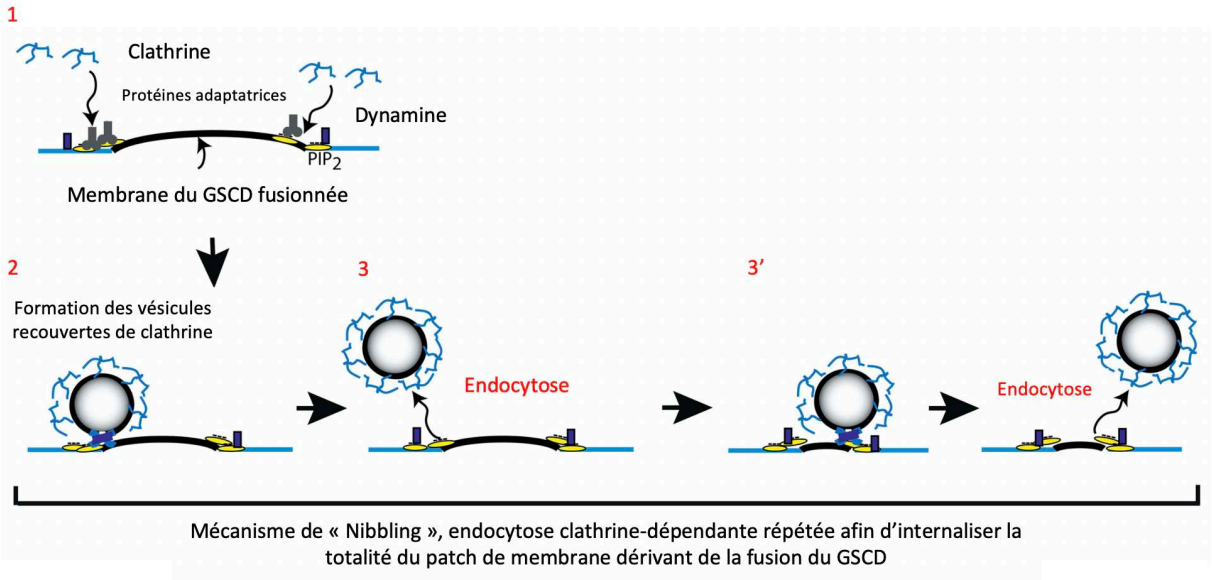


Figure n°27. Modèle du mécanisme d'endocytose clathrine-dépendante se réalisant « partie par partie ». *(1)* Lors de la stimulation, la membrane des GSCD s'insère à la membrane plasmique. Les protéines adaptatrices sont ensuite rapidement recrutées vers les sites de fusion par le PIP2 et les protéines de la membrane granulaire (par exemple synaptotagmin-1, VMAT2) afin de mettre en place l'endocytose compensatrice. *(2)* Ensuite, la liaison de la clathrine permet la formation de vésicules recouvertes de clathrine, dont la scission nécessite une activité de dynamine. *(3 & 3') La* vésicule recouverte de clathrine typique étant trop petite (surface ~ 0,025 μm^2) pour internaliser la totalité du patch de membrane du GSCD (surface ~ 0,282 μm^2) en tant qu'unité, le processus est répété « partie par partie », et le patch est internalisé progressivement. Adapté de Bittner et al., 2013.

V.2 Mécanismes moléculaires du couplage exocytose-endocytose

Différents facteurs sont indispensables au maintien de la balance entre l'exocytose et l'endocytose, tels que le calcium cytosolique, le cytosquelette, les lipides et les protéines membranaires (Wu et al., 2014a).

V.2.1 Le calcium cytosolique

L'influx de calcium *via* les canaux calciques voltage-dépendants déclenche l'exocytose au sein des cellules excitables. La synaptotagmine est le senseur de calcium au niveau du pore du fusion permettant de déclencher l'exocytose des GSCD. Par ailleurs, une augmentation des concentrations calciques intracellulaires accélère mais n'affecte pas

l'amplitude de l'endocytose indépendante/dépendante de la clathrine dans les cellules β pancréatiques (He et al., 2008). De plus, l'élévation des concentrations intracellulaires de calcium initie toutes les formes d'endocytose, rapide ou lente (Hosoi et al., 2009; Wu et al., 2009). Étant donné que l'endocytose est intimement liée à l'exocytose, l'impact de l'influx de calcium sur l'endocytose peut être le résultat de l'impact du calcium lors de l'exocytose. En fait, la relation entre la vitesse de l'endocytose et les concentrations calciques intracellulaires (He et al., 2008) est différente de celle entre les concentrations calciques intracellulaires et l'exocytose (Wan et al., 2004). De même, la suppression ou la mutation des domaines de liaison au calcium de la synaptotagmine 1, C2A et C2B, prolonge la durée de l'endocytose lente de 30 à 50 % mais ne bloque pas complètement l'endocytose (Yao et al., 2011). Ces données suggèrent que le calcium affecte la voie endocytaire *via* une voie indépendante de celle de l'exocytose.

L'utilisation de divers inhibiteurs de la calmoduline (calciprotéine s'associant aux ions calcium) inhibe tous les types d'endocytose dans les neurones du calix de Held (synapse géante du tronc cérébral auditif) ce qui suggère que la calmoduline pourrait être un capteur calcique pour l'endocytose (Wu et al., 2009). Le mécanisme par lequel la phosphorylation de la calmoduline déclenche l'endocytose reste cependant à déterminer. Une autre protéine, la calcineurine, une phosphatase déphosphorylant de nombreuses protéines impliquées dans l'endocytose, pourrait être une cible principale en aval de la calmoduline (Wu et al., 2014b). Il a été démontré que la calcineurine est capable de déphosphoryler sélectivement la dynamine 1 et la dynamine 3 neuronales spécifiques mais pas la dynamine 2 omniprésente. Cependant, d'autres études utilisant des inhibiteurs de calcineurine ne parviennent pas au même résultat (Wu et al., 2014a). Cette discordance peut être en partie expliquée par la diversité des types cellulaires étudiés ou par un manque de spécificité des inhibiteurs pharmacologiques. Il est essentiel de trouver des alternatives pour comprendre ces résultats afin de continuer d'étudier finement la place de l'influx calcique dans le déclenchement de l'endocytose.

Qui plus est, les intersectines (ITSN) semblent également impliquées dans ce processus de couplage exocytose régulée – endocytose compensatrice *via* leur affinité pour le calcium. Les ITSN sont une famille de protéines hautement conservées au cours de l'évolution (Dergai et al., 2010; Guipponi et al., 1998; Roos and Kelly, 1998; Rose et al., 2007; Yamabhai et al., 1998). Elles sont codées par deux gènes *ITSN1* et *ITSN2* chez les vertébrés (codant pour deux isoformes protéiques ; ITSN-L et ITSN-S générées par épissage alternatif), et ont été initialement découvertes comme étant impliquées dans l'endocytose (*via* leurs interactions avec la dynamine, l'AP2, les protéines de la famille des epsines et les synaptojanines) (Gubar et al., 2013; O'Bryan, 2010). D'autres études ont également démontré

que l'ITSN1 est impliquée dans plusieurs autres processus, y compris l'exocytose régulée, entre autres *via* une activation de Cdc42, qui peut à son tour recruter N-WASP et permettre la polymérisation de l'actine (Gasman et al., 2004), ou son interaction avec SNAP-25 (Gubar et al., 2013). Ainsi, un rôle pour l'ITSN1 dans le couplage entre l'exocytose et l'endocytose dans les cellules excitatrices a été avancé. En effet, la présence d'un domaine C2 liant le calcium dans l'ITSN-L laisse supposer son implication à la fois dans l'exo- et l'endocytose (Barg and Machado, 2008). De plus, des études réalisées sur le modèle de ganglion ciliaire du poussin, révèlent que ITSN1-S et ITSN1-L sont associées aux canaux calciques CaV2.2 au niveau des sites d'exocytose (Khanna et al., 2007). Bien qu'il n'existe actuellement aucune preuve directe que l'ITSN1 joue un rôle dans l'endocytose compensatrice des cellules neuroendocrines, de telles données existent pour d'autres types de cellules, comme les cellules neuronales (Gubar et al., 2013). Sur la base de ces données et de la présence de partenaires d'ITSN1 dans les cellules neuroendocrines, un modèle hypothétique concernant le rôle d'ITSN1 dans l'exocytose régulée – endocytose compensatrice a été décrit **(Figure n°28).**

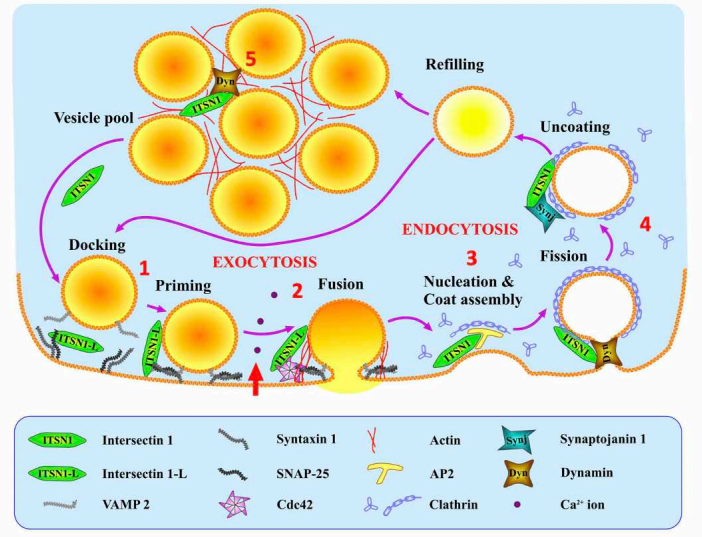


Figure n°28. Modèle de l'implication de l'intersectine 1 (ITSN1) dans le couplage exocytose – endocytose des cellules neuroendocrines. *(1)* SNAP-25 recrute ITSN1-L dans le complexe SNARE (VAMP2, SNAP-25, syntaxine 1) au niveau des sites de fusion. *(2)* ITSN1-L facilite l'exocytose en régulant et activant Cdc42, qui active N-WASP à son tour entrainant la polymérisation de l'actine. *(3)* Immédiatement après la fusion des GSCD et la libération de leur contenu, ITSN1 favorise l'endocytose de la portion membranaire granulaire médiée par la clathrine *via* son interaction avec AP2. *(4)* ITSN1 facilite l'endocytose *via* son interaction avec la dynamine et la synaptojanine. *(5)* ITSN1 reste ensuite associée aux GSCD recyclés (probablement avec la dynamine) pour être de nouveau recrutée au niveau de la membrane plasmique pour le prochain cycle d'exocytose. Adapté de Gubar et al., 2013.

V.2.2 Les lipides

V.2.2.1 Rôle du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

Le PIP2 est un phospholipide minoritaire du feuillet interne des membranes plasmiques. Malgré tout, le PIP2 active les canaux calciques voltage-dépendants qui ont un rôle indispensable en amont de l'exocytose des GSCD (Suh and Hille, 2008). De plus, le PIP2 interagit avec des protéines essentielles au mécanisme d'exocytose, telles que la syntaxine 1, Munc13 ou la synaptotagmine, soit *via* le domaine C2 ou *via* une interaction électrostatique avec des acides aminés basiques (Koch and Holt, 2012). En effet, le PIP2 interagit avec la syntaxine 1 et Munc13, qui régulent l'étape d'arrimage des GSCD, et l'interaction entre le PIP2 et la synaptotagmine semble être essentielle pour les changements de structure dépendants du calcium qui catalysent l'assemblage du complexe SNARE (Liang et al., 2017). D'autre part, le PIP2 contrôle également l'organisation de différentes protéines intervenant dans la mise en place de l'endocytose compensatrice. Grâce à des interactions électrostatiques avec la dynamine, l'AP2, la protéine de détection de courbure membranaire FCHo, l'amphiphysine et les protéines liant le cargo dans les PRC, telles que l'epsine et la synaptojanine, le PIP2 facilite l'initiation, l'assemblage, la maturation et la scission finale des PRC (Wu et al., 2014a). Par conséquent, en étant au centre du recrutement de protéines importantes pour l'exocytose et l'endocytose, le PIP2 pourrait être un facteur de couplage crucial.

V.2.2.2 Rôle de la phosphatidylsérine

Dans les cellules non apoptotiques, plusieurs fonctions biologiques s'accompagnent d'une perturbation de l'asymétrie phospholipidique de la membrane plasmique, entraînant l'externalisation du PS au niveau du feuillet externe (Ikeda et al., 2006). C'est le cas notamment de l'exocytose régulée par le calcium au sein des cellules chromaffines bovines, des cellules PC12 ainsi que dans les neurones (Ceridono et al., 2011; Lee et al., 2000; Malacombe et al., 2006). Le PS est un phospholipide chargé négativement normalement présent au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique, et sa redistribution locale vers le feuillet externe peut avoir des conséquences, telles que *(i)* la formation de plateformes lipidiques qui pourraient être impliquées dans le maintien des constituants de la membrane du GSCD en attente de l'endocytose compensatrice ou *(ii)* le recrutement de protéines impliquées dans l'endocytose (Manno et al., 2002; Yeung et al., 2008). Le marquage par immunogold sur des feuillets de membranes plasmiques démontre que la translocation du PS se produit au niveau des sites de fusion des GSCD. Il a également été constaté que la modification de la fonction de la phospholipide scramblase-1 (PLSCR-1, protéine transmembranaire permettant

l'exposition de la PS au niveau de la surface cellulaire), en exprimant un mutant insensible au calcium ou en utilisant des cellules chromaffines de souris PLSCR-1$^{-/-}$ stimulées avec du potassium, empêche la translocation du PS vers le feuillet externe lors de l'exocytose (Herate et al., 2016; Ory et al., 2013). Par ailleurs, alors que l'exocytose n'est pas affectée dans ces cellules, la recapture de la portion membranaire correspondant à la fusion du GSCD après l'exocytose a été impactée, indiquant que PLSCR-1 est nécessaire pour l'endocytose compensatrice mais pas pour l'exocytose. Ces résultats fournissent la preuve d'un rôle de la réorganisation lipidique spécifique et de l'activité PLSCR-1 calcium-dépendante dans l'endocytose compensatrice neuroendocrine (Ory et al., 2013).

V.2.2.3 Rôle du diacylglycérol

En aval du calcium et du PIP2, Yuan et collaborateurs ont montré que le DAG pourrait être un autre lipide coordonnant exocytose et endocytose. L'influx de calcium active la phospholipase C dépendante du calcium, permettant alors la production d'inositol trisphosphate (IP3) et de DAG, localisée autour des sites de fusion dans les cellules β pancréatiques. En retour, le DAG se lie à Munc13 et active la protéine kinase C, toutes deux essentielles à l'exocytose. Par ailleurs, le DAG est un lipide qui induit une courbure membranaire négative, et donc, l'accumulation de DAG au niveau des sites de fusion permet de réduire l'énergie nécessaire au mouvement des PRC sur la membrane plasmique, guidant ainsi le mouvement des PRC préformés vers les sites de fusion pour médier une endocytose rapide dépendante de la clathrine (Kadamur and Ross, 2013; Yuan et al., 2015).

V.2.3 Le cytosquelette

Au niveau des synapses, des zones denses en filaments d'actine sont souvent observées à proximité de la membrane plasmique. L'actine et des facteurs associés, tels que Cdc42, N-WASP (Neural Wiskott–Aldrich Syndrome Protein) et la protéine de liaison à l'actine (ABP), interagissent directement ou indirectement avec les protéines de la zone active, telles que piccolo, organisant le trafic vésiculaire et la fusion au niveau de la zone active. Cdc42 et N-WASP interagissent également avec les protéines des PRC telles que l'ITSN. Ces données suggèrent que l'actine pourrait servir de lien entre l'exocytose et l'endocytose au niveau synaptique (Alabi and Tsien, 2013). Concernant le rôle de l'actine dans le couplage exocytose – endocytose au sein de cellules neuroendocrines, l'équipe de S. Gasman a mis en évidence que la dépolymérisation des filaments d'actine par la latrunculine B ou la cytochalasine D entraine une inhibition de l'internalisation des clusters DBH situés au niveau de la membrane plasmique des cellules chromaffines, impactant de ce fait l'endocytose compensatrice.

Les microtubules, d'autre part, sont le lien principal entre l'intérieur des cellules et le cortex périphérique de filaments d'actine. Cependant, les microtubules originaires du Golgi peuvent également entrer en contact avec la membrane plasmique *via* CLASP, une protéine de coiffe de l'actine associée aux microtubules (Lansbergen et al., 2006). Grâce à son interaction avec LL5β (lie les phosphoinositides et la filamine), CLASP interagit avec ELKS, une autre protéine de la zone active, et aide à ancrer les microtubules au niveau des sites de fusion. Il a été montré qu'une mutation de CLASP inhibe l'exocytose dans les cellules β pancréatiques, réduit l'endocytose compensatrice et induit une réduction du mouvement des PRC vers les sites de fusion (Yuan et al., 2015). Par conséquent, les microtubules organisés par CLASP et ELKS peuvent être un autre facteur de couplage de l'exocytose avec une endocytose rapide dépendante de la clathrine dans les cellules sécrétrices **(Figure n°29).**

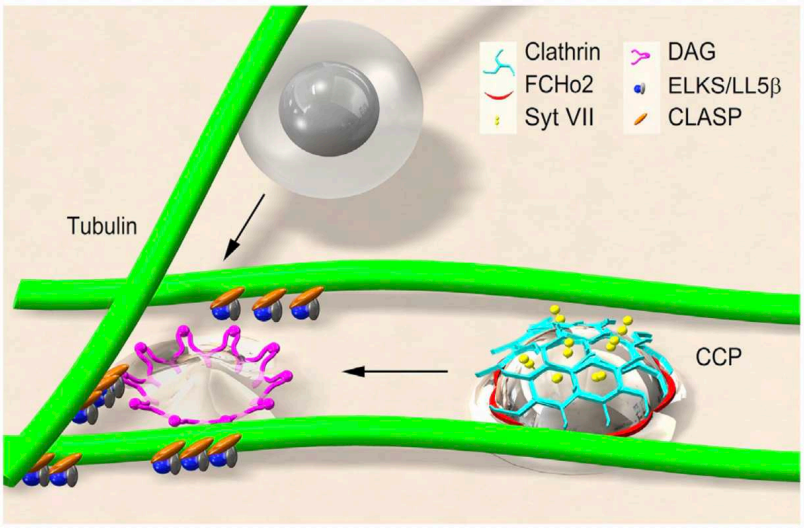


Figure n°29. Rôle des microtubules originaires de l'aire golgienne dans l'exocytose et endocytose compensatrice rapide dépendante de la clathrine. Les microtubules provenant de l'aire golgienne entrent en contact avec CLASP, une protéine de coiffe de l'actine. Grâce à l'interaction de CLASP avec ELKS, une protéine de la zone active et LL5β, liant les phosphoinositides et la filamine, les microtubules vont être ancrés au niveau du site de fusion, facilitant ainsi l'exocytose des GSCD. L'endocytose compensatrice clathrine-dépendante sera permise grâce à l'interaction de FCHo2, une protéine de détection des courbures membranaires, avec le PIP2 et aux gradients de DAG permettant aux puits recouverts de clathrine (CCP) d'être recrutés aux sites d'initiation de l'endocytose rapide dépendante de la clathrine. D'après Yuan et al., 2015.

V.2.4 Les protéines SNARE, la dynamine et l'oligophrénine-1

Les protéines SNARE et les protéines associées telles que la synaptotagmine et Munc13 sont essentielles pour l'exocytose, tout en interagissant également avec les protéines essentielles à l'endocytose. Contrairement au rôle actif qu'elles jouent lors de l'exocytose, les rôles des SNAREs et des protéines associées sont différents durant l'endocytose puisqu'elles servent de site de liaison à des protéines adaptatrices telles que AP2 (Wu et al., 2014a).

La dynamine est une autre protéine qui participe de façon importante à la fois à l'exocytose et à l'endocytose compensatrice. En tant que GTPase, le rôle de la dynamine dans la médiation de la fission des vésicules d'endocytose est bien connu. En ce qui concerne l'exocytose, l'expression d'un mutant de la dynamine dans les cellules PC12 entraîne une activité GTPase élevée, puis raccourci la durée du pied des enregistrements ampérométriques, tandis que l'inverse est observé avec la surexpression d'un mutant de la dynamine possédant une activité GTPase réduite (Anantharam et al., 2011; Jackson et al., 2015). Ces expériences placent la dynamine au tout début de la régulation de l'exocytose, lorsque le pore de fusion est inférieur à 1 nm. Par ailleurs, l'inhibition de la dynamine-1 altère l'exocytose et l'endocytose au niveau des synapses centrales entrainant la mise en place d'une plasticité synaptique différente (Mahapatra and Lou, 2017; Mahapatra et al., 2016), et la suppression de dynamine-2 dans les cellules β pancréatiques entraîne une diminution de la libération d'insuline et des défauts d'endocytose médiée par la clathrine (Fan et al., 2015).
Au sein des cellules chromaffines, il a été mis en évidence par McAdam et collaborateurs que la dynamine 1 peut interagir avec le domaine juxta-membranaire de la synaptotagmine 1 *via* son domaine d'homologie à la pleckstrine (PH). A l'aide de la technique d'ampérométrie, cette équipe a montré que la perte de cette interaction entre la dynamine 1 et la synaptotagmine 1 prolonge la durée du pore de fission lors de l'endocytose clathrine – dépendante conduisant à des défauts dans la dynamique de la fission vésiculaire durant le couplage exocytose – endocytose (McAdam et al., 2015).

L'oligophrénine-1 (OPHN1) est une protéine à plusieurs domaines, notamment un domaine activant les GTPases de la famille Rho (Rho-GAP) et un domaine BAR (Billuart et al., 1998). Impliquée dans le retard mental lié à l'X, OPHN1 a été montrée comme étant impliquée dans le contrôle des fonctions synaptiques, y compris la plasticité synaptique, le trafic de vésicules synaptiques et l'endocytose (Govek et al., 2004; Nakano-Kobayashi et al., 2014). A l'aide de la technique d'ampérométrie, il a été constaté que l'exocytose est altérée dans les cellules chromaffines, de souris Ophn1$^{-/-}$, et au sein de cellules chromaffines bovines exprimant un siRNA *vs* OPHN1. D'autre part, l'endocytose compensatrice, évaluée par la mesure de l'internalisation de la DBH, est sévèrement inhibée dans les cellules chromaffines provenant de souris Ophn1$^{-/-}$. Cet effet inhibiteur est imité par l'expression d'un mutant OPHN1 dépourvu du domaine BAR, démontrant que OPHN1 *via* son domaine BAR est impliqué dans la recapture de la membrane granulaire après l'exocytose (Houy et al., 2015).

En conclusion de cette partie, de nouvelles preuves soutiennent l'idée que, dans les cellules neuroendocrines et dans les neurones, les membranes des GSCD restent sous forme

de radeaux lipidiques au niveau de la membrane plasmique après l'exocytose (Ceridono et al., 2011; Opazo and Rizzoli, 2010; Opazo et al., 2010). La compensation de l'incorporation membranaire par endocytose est un processus critique et une recapture sélective des constituants des GSCD est nécessaire pour maintenir l'homéostasie cellulaire. Les mécanismes qui préservent spécifiquement la plate-forme dérivant de la membrane granulaire et retiennent les composants granulaires ensemble après son incorporation dans la membrane plasmique restent à identifier. Les lipides jouent clairement un rôle central dans ce processus, mais il convient également de prêter attention aux protéines bi-fonctionnelles régulant à la fois l'exocytose régulée et l'endocytose compensatrice ainsi qu'aux protéines ayant un rôle clé dans la formation des GSCD.

VI. Objectifs de l'étude

La sécrétion hormonale est indispensable au maintien de l'homéostasie cellulaire et représente le chef d'orchestre de l'organisme. Lorsque l'équilibre hormonal est altéré, de nombreuses pathologies se développent chez l'Homme, telles que les tumeurs neuroendocrines, l'hypertension artérielle ou encore les troubles métaboliques comme le diabète. De ce fait, l'élucidation des mécanismes étant à l'origine d'une dérégulation de cette sécrétion représente un enjeu majeur afin de mettre au point de nouvelles thérapies et d'améliorer la prise en charge et la qualité de vie des patients.

Mon équipe d'accueil ayant montré le rôle crucial des extrémités N- et C-terminales de la CgA dans la formation des GSCD au sein des cellules neuroendocrines (Elias et al., 2010, 2012; Montero-Hadjadje et al., 2009), **le premier objectif de mes travaux de thèse** a été consacré à l'étude de l'interaction entre la CgA et les phospholipides présents à la membrane du réseau *trans*-golgien. De manière intéressante, certaines études mettaient en évidence la capacité de la CgA à interagir avec les membranes, notamment de par sa structure hélicoïdale. Une étude pionnière de l'équipe de Yoo a mis en évidence que la région N-terminale de la CgA est associée à la membrane des GSCD (Kang and Yoo, 1997). De plus, les régions terminales de la CgA impliquées dans la formation des GSCD présentent des hélices α conservées au cours de l'évolution, structures qui pourraient permettre l'interaction de la CgA avec les phospholipides membranaires (Elias et al., 2010). Différentes études sont venues renforcer cette hypothèse puisque des peptides dérivés de la CgA possédant une structure en hélice α sont capables d'interagir avec les phospholipides membranaires. C'est notamment le cas de la catestatine qui interagit avec la phosphatidylcholine (Sugawara et al., 2010) et de la vasostatine I qui interagit avec la PS (Blois et al., 2006). Ainsi, la première publication

présentée ici porte sur l'étude de l'interaction entre la CgA et le PA, et sur l'impact de cette interaction dans le bourgeonnement des GSCD au sein des cellules neuroendocrines. Notre attention s'est particulièrement focalisée sur le PA du fait de son rôle crucial dans la voie de sécrétion régulée neuroendocrine (Chen et al., 1997; Siddhanta and Shields, 1998; Zeniou-Meyer et al., 2007a).

Le second volet de mes travaux de thèse porte sur l'étude de l'interaction de la CgA avec la membrane plasmique au niveau des sites exocytiques au sein de cellules chromaffines bovines stimulées et de l'implication du PA dans cette interaction. L'équipe de Yoo a montré que la CgA interagit avec la syntaxine 1A et la synaptotagmine I, qui sont des acteurs clés du complexe de fusion au cours des processus exocytiques, suggérant ainsi une participation active de la CgA dans la formation du complexe de fusion et l'exocytose régulée (Yoo et al., 2005). Par ailleurs, de récents travaux réalisés par l'équipe de Holz ont démontré que la CgA est capable de réguler l'expansion du pore de fusion et de ce fait, de contrôler l'exocytose régulée au sein des cellules chromaffines. Ainsi, nous nous sommes demandés si ce rôle de la CgA au niveau de la membrane plasmique pouvait être lié à son interaction avec le PA, qui est lui aussi capable de réguler différentes étapes de l'exocytose au sein de cellules neuroendocrines (Tanguy et al., 2020).

RÉSULTATS

Partie II : Résultats

I. Article 1

La chromogranine A interagit préférentiellement avec l'acide phosphatidique de la membrane golgienne afin d'induire une déformation membranaire et ainsi contribuer à la biogénèse des granules de sécrétion

***The FASEB Journal*. Année : 2020 ; Volume : 34, Issue : 5, Pages : 6769-6790**
Doi : 10.1096/fj.202000074R

Dans de précédents travaux, mon équipe d'accueil a développé une lignée de cellules COS7 exprimant de façon stable la CgA (COS7-CgA), purifié les granules de sécrétion (GSCD) de ces cellules et analysé leur protéome par spectrométrie de masse LC-MS/MS. Parmi les diverses protéines identifiées, l'attention de l'équipe s'est focalisée sur l'actine et la myosine 1b, ce qui a conduit à la mise en évidence de l'implication de ce complexe actomyosine dans le bourgeonnement des GSCD contenant la CgA (article publié en 2017 dans Scientific Reports, dans lequel je suis auteure et que vous trouverez en annexe de ce manuscrit). Cette étude révèle que la formation des GSCD est dirigée d'une part par la CgA, une protéine soluble présente dans la lumière du TGN, et d'autre part par des protéines cytosoliques constituant le complexe acto-myosine. De ce fait, nous nous sommes ensuite intéressés à l'étude des partenaires membranaires de ces protéines au niveau du réseau *trans*-golgien, et plus particulièrement aux lipides, différentes études ayant mis en avant la capacité de la CgA et/ou des peptides dérivés à interagir avec ces composants membranaires (Blois et al., 2006; Elias et al., 2010; Kang and Yoo, 1997; Montero-Hadjadje et al., 2009; Sugawara et al., 2010).

Dans cet article, nous avons ainsi démontré la capacité de la CgA à interagir avec l'acide phosphatidique (PA), un phospholipide clé dans le contrôle de la sécrétion régulée neuroendocrine (Chen et al., 1997; Siddhanta and Shields, 1998; Zeniou-Meyer et al., 2007a), puis nous avons analysé l'impact de cette interaction sur la dynamique membranaire aboutissant au bourgeonnement des GSCD. En effet, nous avons montré dans un premier temps que la CgA interagit préférentiellement avec le PA à l'aide de *lipid strips*, des membranes de nitrocellulose sur lesquelles sont absorbés différents types de lipides. Une

analyse lipidomique par LC-MS/MS a permis d'identifier les espèces de PA prédominantes au sein des membranes golgiennes et granulaires des cellules COS7-CgA et de caractériser plus précisément deux espèces de PA majoritaires : PA (36 : 1) et PA (40 : 6). En utilisant différents modèles (liposomes, Giant Unilamellar Vesicles (GUVs), bicouches membranaires supportées), nous avons montré que la CgA interagit spécifiquement avec ces deux espèces de PA et que ces interactions induisent des déformations membranaires. La surexpression de la sonde PDE4A1-GFP, phosphodiestérase s'associant avec le PA golgien, au sein de cellules PC12, a permis de mettre en évidence que le PA golgien est impliqué dans la biogénèse des GSCD contenant la CgA. Par ailleurs, l'analyse *in silico* de la séquence de la CgA a permis de prédire une région de liaison avec le PA (PABD), structurée sous forme α hélicoïdale, au niveau de l'extrémité C-terminale de la CgA (hCgA$_{364\text{-}381}$). Nous avons montré que ce PABD *(i)* interagit de façon spécifique avec des liposomes enrichis en PA (36 : 1) et *(ii)* est impliqué dans la biogénèse des GSCD. En outre, une altération de la biogénèse des GSCD a été observée suite à l'inhibition pharmacologique de la synthèse du PA *via* la voie de la PLD au sein de cellules PC12 et COS7-CgA, ainsi qu'au sein de cellules chromaffines provenant de souris PLD1$^{-/-}$.

Objectifs :

- $\Rightarrow$ La CgA interagit-elle avec les phospholipides membranaires ?
- $\Rightarrow$ Existe-il une région au sein de la CgA impliquée dans l'interaction avec le PA ?
- $\Rightarrow$ Quelles sont les principales espèces de PA présentes au niveau des membranes golgiennes et granulaire ?
- $\Rightarrow$ La CgA interagit-elle avec les espèces de PA prédominantes ?
- $\Rightarrow$ L'interaction entre la CgA et le PA a-t-elle un impact sur la dynamique membranaire ?
- $\Rightarrow$ L'inhibition de la synthèse du PA a-t-elle un impact sur la formation des GSCD ?

Received: 10 January 2020 | Revised: 28 February 2020 | Accepted: 14 March 2020

DOI: 10.1096/fj.202000074R

RESEARCH ARTICLE

THE FASEB JOURNAL

Chromogranin A preferential interaction with Golgi phosphatidic acid induces membrane deformation and contributes to secretory granule biogenesis

Ophélie Carmon[1] | Fanny Laguerre[1] | Lina Riachy[1] | Charlène Delestre-Delacour[1] | Qili Wang[2] | Emeline Tanguy[2] | Lydie Jeandel[1] | Dorthe Cartier[1] | Tamou Thahouly[2] | Anne-Marie Haeberlé[2] | Laetitia Fouillen[3] | Olivier Rezazgui[4] | Damien Schapman[5] | Alexandre Haefelé[4] | Yannick Goumon[2] | Ludovic Galas[5] | Pierre-Yves Renard[4] | Stéphane Alexandre[6] | Nicolas Vitale[2] | Youssef Anouar[1] | Maité Montero-Hadjadje[1]

[1]Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale de Normandie, Normandie University, UNIROUEN, INSERM, U1239, Rouen, France

[2]Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

[3]Laboratoire de Biogénèse Membranaire, CNRS, Plateforme Métabolome, Université de Bordeaux, UMR-5200, Villenave D'Ornon, France

[4]INSA Rouen, CNRS, Normandie University, UNIROUEN, COBRA, UMR 6014 and FR 3038, Rouen, France

[5]Normandie University, UNIROUEN, INSERM, PRIMACEN, Rouen, France

[6]Polymères, Biopolymères, Surfaces Laboratory, CNRS, Normandie University, UNIROUEN, UMR 6270, Rouen, France

Correspondence
Maité Montero-Hadjadje, Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale de Normandie, Normandie University, UNIROUEN, INSERM, U1239, Rouen 76000, France.
Email: maite.montero@univ-rouen.fr

Present address
Charlène Delestre-Delacour, Laboratoire GLYCOMEV, Fédération de recherche Normandie-Végétal - FED 4277, GDR CNRS 3711 COSM'ACTIFS, Normandie University, UNIROUEN, Rouen, France

Funding information
Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Grant/Award Number:

Abstract

Chromogranin A (CgA) is a key luminal actor of secretory granule biogenesis at the *trans*-Golgi network (TGN) level but the molecular mechanisms involved remain obscure. Here, we investigated the possibility that CgA acts synergistically with specific membrane lipids to trigger secretory granule formation. We show that CgA preferentially interacts with the anionic glycerophospholipid phosphatidic acid (PA). In accordance, bioinformatic analysis predicted a PA-binding domain (PABD) in CgA sequence that effectively bound PA (36:1) or PA (40:6) in membrane models. We identified PA (36:1) and PA (40:6) as predominant species in Golgi and granule membranes of secretory cells, and we found that CgA interaction with these PA species promotes artificial membrane deformation and remodeling. Furthermore, we demonstrated that disruption of either CgA PABD or phospholipase D (PLD) activity significantly alters secretory granule formation in secretory cells. Our findings show for the first time the ability of CgA to interact with PLD-generated PA, which allows

Abbreviations: AFM, atomic force microscopy; CgA, chromogranin A; CgB, chromogranin B; DOPC, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; FIPI, 5-Fluoro-2-indolyl des-chlorohalopemide; *g*CW STED, time-gated continuous wave stimulated emission depletion; GUV, giant unilamellar vesicle; ITC, isothermal titration calorimetry; PA, phosphatidic acid; PABD, PA-binding domain; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PS, phosphatidylserine; PDE4A1, cAMP phosphodiesterase-4A1; PLD, phospholipase D; SgII, secretogranin II; Spo20p, sporulation-specific protein 20; SUV, small unilamellar vesicle; TGN, *trans*-Golgi network.

Ophélie Carmon, Fanny Laguerre, Lina Riachy, Nicolas Vitale, Youssef Anouar, and Maité Montero-Hadjadje equally contributed to this work.

© 2020 Federation of American Societies for Experimental Biology

DEI20151234424; European Regional Development Fund (ERDF), Grant/Award Number: ERDF DO-IT2015 and ERDF - PACT-CBS; Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur; European Union and Région Normandie; Agence Nationale de la Recherche (ANR), Grant/Award Number: ANR-11-INBS-0010

membrane remodeling and curvature, key processes necessary to initiate secretory granule budding.

KEYWORDS

Golgi apparatus, membrane dynamics, organelle biogenesis, phospholipase D

1 | INTRODUCTION

Secretory granules are vesicular organelles which materialize the regulated secretory pathway, allowing release of signal molecules such as hormones and neurotransmitters from endocrine, neuroendocrine, and most neuronal cells. Secretory granules are formed by budding from the trans-Golgi network (TGN) membrane in a very efficient manner and more than several thousand can accumulate in neuroendocrine cells for active release upon cell stimulation, most likely involving a specific budding process from the Golgi apparatus.[1] It is now well established that membrane remodeling at the TGN is an important process for secretory granule budding, but the identity of the molecular actors, the sequence of events, and the mechanisms involved are not elucidated to date.

The TGN membrane is composed of a broad spectrum of lipids with specific properties that profoundly define its identity and function,[2] but their contribution to secretory granule biogenesis has only recently emerged. Membrane proteins are known to influence lipid organization and conversely protein function and clustering are also under the control of lipids, leading to the formation of TGN membrane microdomains that have been proposed to regulate the budding of secretory granules.[3] For instance, in vitro and in vivo studies revealed that depletion of cholesterol alters secretory granule biogenesis,[4,5] and the regulated production and organization of sphingomyelin, which assembles with cholesterol to generate microdomains in the membranes, has been shown to be crucial for the biogenesis of cargo carriers at the Golgi membranes.[6] Moreover, the TGN membrane cytosolic leaflet is highly enriched in phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P), which may directly induce membrane curvature and/or recruit membrane-deforming cytosolic PI4P-binding proteins.[7] Thus, besides the TGN membrane components, cytosolic, but also luminal molecular components potentially influence membrane organization and shape. Among the luminal components, several glycoproteins of the granin family were proposed to play a crucial role in secretory granule biogenesis.[8] In particular, chromogranin A (CgA) was shown to contribute to hormone aggregation and secretory granule biogenesis.[9-11] Indeed, deletion of the CgA gene (*Chga*) led to decreased secretory granule number associated to metabolic complications such as cardiovascular defects and obesity in knockout mice,[12,13] implying a major contribution of CgA in catecholamine and insulin storage and release. In previous studies, we have shown that ectopic CgA expression induced the formation of secretory granule-like structures in COS7 cells, which are normally devoid of secretory granules and granin expression,[14,15] confirming the important role of CgA in granulogenesis. These observations suggested that CgA could act at the level of the TGN membrane to trigger the formation of secretory granules; however, the mechanism involved is still unknown.

The first indication for a role of CgA at the TGN level is related to its acidic nature, which confers to this granin the ability to aggregate with neuropeptides and hormones in the luminal TGN condition.[9] Besides these soluble aggregates, a fraction of CgA was found to be tightly associated with secretory granule membrane,[16] suggesting that CgA/hormone aggregates might interact with the TGN membrane. Indeed, the conserved α-helical organization of CgA terminal regions, which confers to the protein the ability to trigger secretory granule formation and to sort hormones to the regulated secretory pathway,[11,14] the faculty of CgA to regulate fusion pore expansion[17] and the widespread expression of this granin argue for a role of CgA in granulogenesis through direct interaction with membranes. In fact, CgA-derived peptides with the conserved α-helical conformation have been shown to interact with membrane lipids. For instance, the conserved N-terminal peptide of CgA named vasostatin I (hCgA1-76) interacts with phosphatidylserine (PS) in phospholipid monolayers[18] and cell surface,[19] whereas the peptide catestatin (hCgA352-372) binds to phosphatidylcholine (PC) micelles.[20] As it is now well established that lipid composition and properties define organelle identity and function, we explored the possibility that an interaction between CgA and specific lipids of the TGN membrane could promote secretory granule biogenesis. In this study, we observed that CgA interacts with phosphatidic acid (PA) and phosphoinositides in membrane models and that ectopic expression of a cytosolic probe, which buffers Golgi PA in secretory cells impaired the formation of CgA-containing granules. Moreover, we found that CgA preferentially interacts with few PA species enriched in purified Golgi and secretory granule membranes in vitro, through a newly identified

PA-binding domain (PABD). Using giant unilamellar vesicles (GUVs) enriched with Golgi and secretory granule PA species, we observed that CgA induces GUV membrane remodeling and deformation in a dose-dependent manner. Interestingly, deletion of the identified PABD in CgA significantly reduced secretory granule biogenesis. Finally, genetic and pharmacological evidence revealed that inhibition of phospholipase D (PLD), a major source of PA production in the Golgi, alters secretory granule formation in neuroendocrine cells.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Cell culture and transfection

African green monkey kidney fibroblast-derived COS7 cells (American Type Culture Collection; CRL 1651), wild-type or stably expressing CgA developed previously15 and mouse corticotrope-derived AtT20/DC16v-F2 cells (American Type Culture Collection; CRL 1795) were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, Thermo Fisher Scientific) supplemented with 5% of heat-inactivated and sterile-filtered fetal bovine serum (FBS, Sigma - Aldrich), 100 U mL^{-1} penicillin, 100 μg mL^{-1} streptomycin (Gibco, Thermo Fisher Scientific), and 300 μg mL^{-1} geneticin (G-418 sulfate, Life Technologies, Inc, UK) to maintain gene resistance selection, at 37°C in 5% of CO_2. Rat pheochromocytoma PC12 cells (American Type Culture Collection; CRL 1721) were routinely grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, Thermo Fisher Scientific) supplemented with 5% of FBS, 10% of sterile-filtered HyClone Donor Equine serum (GE Healthcare, Life Sciences), 100 U mL^{-1} penicillin, 100 μg mL^{-1} streptomycin (Gibco, Thermo Fisher Scientific) and 1% of L-glutamine 100X (Gibco, Thermo Fisher Scientific), at 37°C in 5% of CO_2. For immunofluorescence (IF) experiments, COS7-WT, PC12, and AtT20 cells were transfected with 0.8 μg of DNA encoding GFP-tagged human CgA (CgA-GFP), GFP-tagged human ΔPABD CgA (CgAΔPABD-GFP), GFP-tagged rat PDE4A1(PABD) (PDE4A1 WT), or GFP-tagged rat PDE4A1(mutated PABD) (PDE4A1 Mut), and 2 μL of Lipofectamine 2000 (Invitrogen) per well (24-well plate) according to the manufacturer's protocol. Four or five hours after the beginning of transfection, the culture medium was replaced by supplemented DMEM, and cells were additionally cultured for 24-48 hours. For Western blot experiments, COS7-WT and AtT20 cells were transfected with 4 μg of DNA encoding CgA-GFP or CgAΔPABD-GFP, and 8 μL of Lipofectamine 2000 (Invitrogen) per well (6-well plate) according to the manufacturer's protocol. Four or five hours after the beginning of transfection, the culture medium was replaced by supplemented DMEM, and cells were additionally cultured for 48 hours.

2.2 | Plasmid constructs

Full-length CgA-GFP (pCgA-EGFP-N2) kindly provided by M. Courel (UPMC, Paris, France) was used to amplify the sequence of CgA-encoding region by PCR using the sense primer (5′-CTCGAGGCCACCATGCGCTCCGCCGCTGTCTC GGCTTCTT-3′), including an Xho1 restriction site (underlined bases), and the antisense primer (5′-CCGCGGGCG CCCCGCCGTAGTGCCTGCA-3′), including a SacII restriction site before cloning into a pGEM-T vector (Promega, Charbonnières, France). Site-directed mutagenesis was conducted by using the QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent technologies, Les Ulis, France) and specific primers (sense: 5′-CTCTCCTTCCGGGC CCGGGCCTACGAGGACAGCCTTGAGGCGGGCC TG-3′; antisense: (5′-CAGGCCCGCCTCAAGGCTGTCCT CGTAGGCCCGGGCCCGGAAGGAG.

AG-3′) designed to remove the CgA PABD sequence (residues 364-381). The amplified mutated CgA (with deleted PABD region) was digested with the appropriate enzymes (Xho1 and SacII) and subcloned into the eukaryotic expression vector pEGFP-N2. All the constructs were verified by restriction enzyme digestion and DNA sequencing. PDE4A1 WT and PDE4A1 Mut constructs were described previously.[21]

2.3 | Animals

Pld1 knockout mice were described previously.[22,23] They were housed and raised at Chronobiotron UMS 3415. All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24th November 1986 (86/609/EEC) and resulting French regulations. Accordingly, the CREMEAS local ethical committee approved all experimental protocols. Every effort was made to minimize the number of animals used and their suffering.

2.4 | Proteins and antibodies

Recombinant CgA (human chromogranin A 19-457aa, His tag, *E coli*, ATGP0323, Atgen global) was used for lipid strips and GUVs experiments. For CgA-Alexa488 coupling, all reactants and solvents were purchased from TCI-Chemicals and Alfa Aesar. CgA labeling was performed according to a modified version of a protocol reported in Chevalier et al[24] First, 82 μL (1 eq.) of Alexa488 solution (2 mg mL^{-1} in anhydrous N, N dimethylformamide) were introduced into a

1 mL round-bottom flask. (O-(N-succinimidyl)-N,N,N′,N′-tetramethyluronium tetrafluoroborate (70 μg, 1.2 eq.) and N,N-diisopropylethylamine (0.04 mL, 1.2 eq.) were added and the reaction medium was placed under argon, with magnetic stirring at RT during 1 hour, to obtain the N-hydroxysuccinimidyl activated ester. A solution of 250 μg of CgA in PBS buffer (pH 7.2, 0.5 mg mL^{-1}, 1 eq.) was then slowly added dropwise in the reaction medium, for a ratio Alexa488/CgA 10/1. Reaction was carried out under argon, magnetic stirring, and at RT overnight. Purification was performed using 10 kDa centrifugation filters (Spin-X UF 500, CORNING) previously conditioned with PBS to remove glycerol and other biocidal compounds. Labeled protein was collected in PBS buffer following three centrifugations of 10 minutes at 7500 rpm. Grafting rate was evaluated by Western blot and UV-Vis spectroscopy (λabs = 494 nm), with a maximum labeling rate of 5.6 Alexa488 molecules per protein.

Primary antibodies used were goat polyclonal anti-CgA (sc-23556; Santa-Cruz Biotechnology inc.) (1:200), rabbit polyclonal anti-CgA (WE-14[25]) (1:1000), rabbit polyclonal anti-CgA (RV31.4 (14) (1:1000), rabbit polyclonal anti-SgII (EM66[26]) (1:1000), goat polyclonal anti-CgB (sc-1489; Santa-Cruz Biotechnology inc.) (1:1000), mouse monoclonal anti-GM130 (BDBiosciences) (1:1000), mouse monoclonal anti-CALR (clone 1G11-1A9, Sigma-Aldrich) (1:1000), mouse monoclonal anti-GLUD1 (clone 3C2, Sigma-Aldrich) (1:500), mouse monoclonal anti-golgin 97 (A21270; Invitrogen) (1:500), mouse monoclonal anti-α-tubulin (T5168, Sigma-Aldrich) (1:5000). For IF, secondary antibodies used were Alexa 488-conjugated donkey anti-rabbit IgG; Alexa 594-conjugated donkey anti-mouse IgG (Invitrogen) (1:500). For Western blotting, anti-rabbit, anti-mouse, and anti-goat secondary antibodies conjugated to horseradish peroxydase (Thermo Fisher Scientific) (1:5000) were used.

2.5 | Protein-lipid binding assay

Membrane lipid strips (P-6002, Echelon Biosciences) were saturated in PBS-T buffer (0.1% v/v Tween 20 in PBS) supplemented with 3% of fatty acid-free BSA (Sigma-Aldrich) for 1 hour at RT, and then, incubated with 500 ng mL^{-1} recombinant human purified CgA diluted in this buffer for an additional hour at RT. After several washes with PBS-T, the membranes were incubated with anti-WE-14 antibody (1:1000) 1 hour at RT in the saturation buffer. After washing with PBS-T, membranes were incubated with a secondary antibody coupled to horseradish peroxydase (Thermo Fisher Scientific) and visualized by enhanced chemiluminescence. Densitometric analysis was performed to determine the relative affinity of CgA binding to various phospholipids.

2.6 | Subcellular fractionation

Cells were collected in PBS and sedimented by centrifugation at 400 *g* for 5 minutes at 4°C. The cell pellet was disrupted by 5 pulls/pushes through a 21-, and then, a 25-gauge needle attached to a syringe, in ice-cold buffer (0.32 M sucrose, 20 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mL g^{-1} of cells). The resulting lysate was centrifuged at 800 *g* for 30 minutes at 4°C.

2.6.1 | Golgi membrane purification

The protocol used was adapted form that developed by Graham et al[27] for the isolation of Golgi membranes from cultured cells by flotation through a discontinuous sucrose gradient. Briefly, Golgi membranes are isolated from low-speed pellets traditionally referred to as the nuclear pellet; hence, the upper layer of the pellets (containing plasma, ER, and Golgi membranes) were suspended in 1.4 M of sucrose. The homogenate was deposited on a succession of 2 mL 1.4 and 2.0 M of sucrose cushions, and then, covered with 2 mL 1.2 and 0.8 M of sucrose cushions and 10 mL 0.32 M of sucrose cushion, all sucrose cushions containing 10 mM of Tris-HCl at pH 7.4. The extracts were then centrifuged at 10 000 *g* for 18 hours at 4°C. The different fractions were collected in hemolysis tubes and kept at −20°C. An aliquot of each fraction was used for the localization of Golgi apparatus by Western blot using specific antibodies to recognize plasma membrane, Golgi, nucleus, mitochondria, and the endoplasmic reticulum.

2.6.2 | Secretory granule purification

Postnuclear supernatants were centrifuged at 20 000 *g* for 20 minutes at 4°C. Pellets containing dense-core granules were centrifuged on a multistep gradient of 1 to 2.2 M of sucrose (1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2, and 2.2 M sucrose; 5 mL steps), at 100 000 *g* for 12 hours at 4°C. All gradient steps were collected from the top of the tube in 5 mL fractions, and analyzed by western blotting to identify the granule-containing fractions and to verify their degree of purification.

2.7 | Lipidomic analysis

Total lipids from recovered Golgi and granule fractions were extracted by the method of Bligh and Dyer.[28] Lipid extracts were resuspended in 50 μL of eluent A. Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analyses were performed with a MS model QTRAP 6500 (Sciex) coupled to an LC system (1290 Infinity II, Agilent). Analyses were achieved in the negative (PA); nitrogen was

used for the curtain gas (set to 15), gas 1 (set to 20) and gas 2 (set to 0). Needle voltage was at −4, 500 without needle heating; the declustering potential was adjusted set at −180 V. The collision gas was also nitrogen; collision energy is set to −50 eV. Reversed phase separations were carried out at 50°C on a Luna C8 150 × 1 mm column, with 100 Å pore size, 5 μm particles (Phenomenex, Torrance, USA). Eluent A was isopropanol/CH_3OH/H_2O + 0.2% formic acid + 0.028% NH_3 and eluent B was isopropanol + 0.2% formic acid + 0.028% NH_3. The gradient elution program was as follows: 0-5 minutes, 30%-50% B; 5-30 minutes, 50%-80% B; 31-41 minutes, 95% B; 42-52 minutes, 30% B. The flow rate was set at 40 μL min^{-1}; 3 μL sample volumes were injected. Quantitative PA analyses were made based on MS/MS multiple reaction monitoring (MRM) as described.[29] Briefly, MRM transitions for individual PAs were determined using PA standards (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA). The predominant daughter fragment ions were then used for quantitative MRM analysis. MRM transitions and specific retention times were used to selectively monitor PA using MultiQuant software (v3.0, Sciex).

2.8 | Liposome and giant unilamellar vesicle formation and use

2.8.1 | Liposome flotation and binding assays

Lipids solubilized in chloroform were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA) and were used without further purification. Liposome mixtures were prepared in mass ratios composed of 90% DOPC (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), 5% PE-NBD (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)), and 5% PS (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine), PI(4,5)P_2 (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-myo-inositol-4',5'-bisphosphate)), egg PA mix or PA species (36:1 (1-stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphate), 36:2 (1-stearoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphate), 40:6 (1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-*sn*-glycero-3-phosphate), or 36:0 (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphate). Lipids were dried in a stream of nitrogen and kept under vacuum for at least 2 hours. Dried lipids were then suspended in liposome-binding buffer (LBB: 20 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$) by three freeze and thaw cycles and were extruded using a Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) through polycarbonate track-etched membrane filters to produce liposomes of 200 nm in diameter. The liposomes were then diluted in LBB (1:10) and incubated with 30 μg of COS7-CgA extract during 20 minutes. Then, samples were centrifuged at 200 000 *g* (1 hour at 4°C) on a multistep gradient sucrose. To determine the association of CgA with liposomes, the fractions were collected after centrifugation, and the presence of CgA was revealed using western blot analysis of the different fractions.

To quantify liposome binding to GST-CgA-PABD linked to GSH-Sepharose beads, GST and GST-PABD constructs (330 pmol) bound to GSH beads were washed once with 1 mL of LBB medium before incubation for 20 minutes in the dark at room temperature and under agitation with liposomes containing a 10-fold molar excess of PA relative to the quantity of GST proteins in a final volume of 200 μL of LBB. Beads were washed three times with 1 mL of ice-cold LBB and collected by centrifugation at 3000 rpm for 5 minutes. Liposome binding to the PABD was estimated by measuring the fluorescence at 535 nm with a Mithras fluorimeter (Berthold). Triplicate measurements were performed for each condition. Fluorescence measured with GST linked to GSH-Sepharose beads alone was between 3 and 4 AU and was subtracted from sample measurements.

2.8.2 | Giant unilamellar vesicle preparation

GUVs were prepared by polyvinyl acetate (PVA, MW 145000, purchased from VWR International, Fontenay-sous-Bois, France) – assisted swelling. Briefly, a Teflon plate was used and was cleaned twice with 99% of ethanol. A 5% (w/w) solution of PVA was prepared by stirring PVA in water while heating at 90°C. PVA-coated substrates were prepared by spreading 100-300 μL of PVA solution on a clean Teflon plate, and dried for 30 minutes at 80°C. About 10-20 μL of a lipid mixture (95% of DOPC, 4% of PA (36:1) or (40:6), and 1% of PE-NBD) dissolved in chloroform (1 mg mL^{-1}) was spread on the dried PVA film and placed under vacuum overnight at RT to evaporate the solvent. A chamber around the drops of lipids was formed with Vitrex and filled with 100 mM of sucrose and 150 mM of NaCl solution during 3 hours at room temperature, allowing the formation of GUVs with a suitable size. Next, the buffer containing GUVs is recovered using a rib with a wide tip to avoid destroying the GUVs, and deposited in LabTek wells (LabTek I non-separable, on glass coverslip, 4 culture chambers, Nunc), which were previously coated with a 1 mg mL^{-1} BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma—Aldrich) solution. To allow the sedimentation of GUVs, we added the same volume (100 μL) of a solution containing 90 mM of glucose and 15 mM of NaCl in LabTek wells. The sedimentation of the GUVs takes place for about 1 hour at RT.

To test the effect of CgA on the GUV membranes, we added CgA or CgA-Alexa488 in GUV-containing LabTek wells at a final concentration of 2, 4, or 6 μM just before the beginning of confocal microscopy acquisitions.

2.8.3 | Small unilamellar vesicle preparation

Small unilamellar vesicles (SUVs) were prepared using the standard extrusion method as described previously for liposome formation. Liposome mixtures repaired in mass ratios composed of 90% of DOPC, 10% of PA (36:1) were dissolved in a test tube with chloroform. Lipids were dried under argon gaz. The lipid film thus obtained was hydrated with 500 µL of water and the solution was subjected to vortex mixing for 1 hour at room temperature. The multilamellar vesicles were extruded 27 times using the Mini-Extruder equipped with a polycarbonate membrane filter of 100 nm pore diameter to obtain SUVs.

2.9 | Atomic force microscopy measurements

2.9.1 | Membrane preparation

GUVs were prepared by using 100% of DOPC or a mix of 90% of DOPC and 10% of PA (36:1). The vesicles were prepared in a 200 mM of sucrose solution. GUV solution was diluted 100 times in 250 mM of glucose solution to promote their sedimentation and to avoid multilayers. Final lipid concentration was 10 µM. The vesicle solution was injected in the AFM liquid cell and put in contact with freshly cleaved mica. After 2 min, the vesicle solution is replaced with 250 mM of glucose solution in order to maintain the supported lipid bilayers hydrated at all times during imaging. To study protein/lipid interactions, the glucose solution was replaced with a CgA solution (0.6 or 1.2 µM), and the sample was imaged again.

2.9.2 | Microscopy imaging

AFM measurements were performed on a multimode atomic force microscope (Nanoscope IIIA, Veeco, USA). Supported lipid bilayers images were taken in tapping mode in the fluid cell. A soft cantilever with a typical spring constant of 0.06 N/m and equipped with a silicon nitride tip was used. The tip velocity was set between 5 and 10 µm/s by varying the scan rate according to the scan size. The cantilever oscillation was tuned to a frequency between 20 and 30 kHz, and the amplitude was set between 0.8 and 2 V. All the experiments were carried out at a temperature of 21°C.

2.10 | High-sensitivity isothermal titration calorimetry

Isothermal titration calorimetry (ITC) was performed on an Affinity instrument (TA Instrument, New Castle, DE) equipped with a 185 µL reaction chamber. Solutions were degassed under low pressure before use to avoid the formation of air bubbles while titrating. The CgA solution (5 µM) was placed in the calorimeter chamber and SUV suspension (10 mM) was injected in aliquots of 2.5 µL. The period between two successive injections was typically 200 seconds to allow the system to reach equilibrium. The solution was stirred continuously at 125 rpm and the experiments were carried out at a temperature of 10°C. The resulting heat changes after SUV injection were recorded as a function of time. The heat of reaction was obtained by integrating the area under each peak of heat flow tracings, using the heat of SUV dilution in water as blank sample. The data were acquired by using the NanoAnalyze software (v.3.10.0, TA Instrument).

2.11 | Immunofluorescence labeling

COS7-CgA cells were cultured in 24-well plates (Costar 24 Well Clear TC-Treated Multiple Well Plates, Corning), onto glass coverslips and fixed with 4% of paraformaldehyde (Sigma—Aldrich) in PBS at RT for 15 minutes. Cells were permeabilized and blocked for 30 minutes with 0.3% Triton X-100 (Thermo Fisher Scientific), in PBS containing 5% of normal donkey serum (Sigma—Aldrich) (1:50) and 1% of BSA. Cells were then incubated for 2 hours at RT with primary antibodies, and, after washing with PBS, for 1 hour with secondary antibodies. Nuclei were stained with DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindole, Molecular probes) (1 µg mL^{-1}). To verify the specificity of the immunoreactions, the primary or secondary antibodies were substituted with PBS.

2.12 | Protein electrophoresis and western blotting

Cells were harvested by scraping in NP40 cell lysate buffer (Thermo Fisher Scientific) supplemented with a cocktail of protease inhibitors (Thermo Fisher Scientific), homogenized, and proteins were separated by SDS-PAGE followed by Western blotting. Membranes were incubated in a blocking buffer containing 5% of nonfat dry milk in PBS containing 0.5% of Tween 20 (Sigma—Aldrich) (PBS-T) for 1 hour at RT, and overnight with primary antibodies at 4°C. Then, membranes were washed for 45 minutes with PBS-T. Blots were subsequently incubated for 1 hour with appropriate HRP (Horse Radish Peroxidase)-conjugated secondary antibody (Thermo Fisher Scientific) in blocking buffer. Membranes were washed for 45 minutes with PBS-T and immunoreactive proteins were detected by chemiluminescence (Bio-Rad Biotechnology). Quantification was performed using Image Lab software (5.0 build 18, 2013 version, Bio-Rad

Laboratories). The mean intensity of each individual band of interest was calculated after background value subtraction.

2.13 | Image acquisition

For GUVs experiments, real-time videomicroscopy was carried out with an inverse confocal microscope TCS-SP5 AOBS (*Acousto-Optical Beam Splitter*), equipped with pulsed white light laser (WLL) and with a 63X oil immersion objective (Leica Microsystems). PE-NBD was excited at 463 nm and observed in a 510-550 nm window. Images were acquired at a speed of one frame per 2 seconds during 1 minute.

For immunocytochemistry experiments, confocal microscopy was carried out with a TCS-SP8 upright confocal laser-scanning microscope equipped with 63X oil immersion objective (NA = 1.4; Leica, Microsystems). Alexa 488 and GFP were excited at 488 nm and observed in a 505-540 nm window. Alexa 594 was excited at 594 nm and observed in a 600-630nm window. For dual color acquisition, images were sequentially acquired in line scan mode (average line = 2). Overlays were performed with post acquisition Leica Confocal Software functions to obtain the presented snapshots.

For super-resolution experiments, image acquisitions were performed with a 100X oil immersion objective (NA 1.4) through time-gated continuous wave stimulated emission depletion (*g*CW STED) imaging (TCS SP5-X; Leica Microsystems)[30] with optimized parameters for GFP detection (Figure S2). Samples (zoom 8, pixel size = 18.95 nm) were excited with a 488 nm wavelength of a supercontinuum laser (20%-30% AOTF). A conventional scanner (400 Hz, Line Average 1, Frame Average 1, Frame Accumulation 3, 1024 × 1024) was used. Depletion was obtained with a 592 nm laser (70% AOTF). Fluorescence (500-550 nm) was collected with a hybrid detector (Gain 100) in the gated mode and a pinhole for Airy 1.

2.14 | Transmission electron microscopy of WT and *Pld1*$^{-/-}$ chromaffin cells in situ

WT and *Pld1*$^{-/-}$ mice were anesthetized with a mixture of ketamine (100 mg kg^{-1}) and xylazine (5 mg kg^{-1}) and transcardiaally perfused with 0.1 M of phosphate buffer, pH 7.3, containing 2% of paraformaldehyde and 2.5% of glutaraldehyde. The 2-mm-thick slices were cut from the adrenal glands and postfixed in 1% of glutaraldehyde in phosphate buffer overnight at 4°C. The slices were then immersed for 1 hour in OsO4 0.5% in phosphate buffer. 1-mm^3 blocks were cut in the adrenal medulla, dehydrated, and processed classically for embedding in Araldite and ultramicrotomy. Ultrathin sections were counterstained with uranyl acetate and examined with a Hitachi 7500 transmission electron microscope.

2.15 | Post-acquisition analysis

The following procedure was used to measure the number of CgA granules. The confocal section generated by the Leica TCS-SP8 confocal microscope was analyzed with Imaris and converted into an Imaris file. A broad region of interest (ROI) was defined around a cell. Then with the tool "spots detection" on Imaris, the number of spots with a diameter >200 nm was quantified. Spots statistics are automatically computed for each spot object. It provides a procedure to automatically detect point-like structures, an editor to manually correct detection errors, a viewer to visualize the point-like structures as spheres, and statistics output.

To analyze secretory granule density in wild-type (WT) and *Pld1* knockout chromaffin cells, secretory granules were counted in 50 chromaffin cells from WT and *Pld1* KO mice with a visible nucleus randomly selected in ultrathin sections from several blocks (1 section/block) from each mouse (n = 3 mice per genotype). Dense core diameter was measured from 950 randomly selected granules for each genotype using the line segment tool of Image J. To minimize the bias measurements, samples were blinded.

To improve signal-to-noise ratio in STED images, deconvolution of raw data was obtained through image processing with Huygens professional 4.5.1 software (SVI, The Netherlands).[31]

2.16 | Statistics

Data were analyzed with the Prism program (GraphPad 6.04 Software). For the quantification of the number of CgA granules in IF studies, statistical significance was determined by Mann-Whitney U test. Values are expressed as means ± SEM or SD, and the level of significance is designated in the figure legend as follows: $*P < .05$, $**P < .01$, $***P < .001$. For the quantification of CgA signal in lipid strip experiments, statistical significance was determined by an (ANOVA) one-way analysis of variance test with Bonferroni's comparison test. Values are expressed as means ± SEM, and the level of significance is designated in the figure legend as follows: $***P < .001$. For the quantification of membrane deformation after CgA addition on GUVs, statistical significance was determined by Mann-Whitney U test. Values are expressed as means ± SEM, and the level of significance is designated in the figure legend as follows: $***P < .001$. For the quantification of the number of secretory granules and their dense core diameter in MET study, statistical significance was determined by Mann-Whitney U test. Values are expressed as means ± SEM, and the level of significance is designated in the figure legend as follows: $*P < .05$.

3 | RESULTS

3.1 | Chromogranin A interacts preferentially with PA

Due to the presence of two helicoidal motives in its N- and C-terminal conserved regions, which bear the granulogenic activity of CgA and which can promote binding to lipids,11 we analyzed the capacity of the granin to interact with membrane lipids. A lipid overlay assay was performed by incubating recombinant CgA with a nitrocellulose sheet where different membrane lipids were adsorbed. Using an antibody raised against CgA,[25] this overlay assay revealed that CgA interacts with PA and phosphoinositides (PIP, PIP_2, and PIP_3) (Figure 1A). Quantification of the CgA-lipid interaction signals revealed that CgA preferentially interacts with PA (Figure 1A).

3.2 | Golgi PA is involved in the biogenesis of CgA-containing secretory granules

To examine the importance of PA in the formation of CgA-induced secretory granules, we overexpressed the PABD of the cytosolic phosphodiesterase PDE4A1 in neuroendocrine PC12 cells in order to reduce the ability of CgA to interact with PA in Golgi membranes. Indeed, PDE4A1-PABD was previously shown to interact with PA specifically at the TGN in COS1 cells[32] and RAW264.7 macrophages,[21] and its overexpression should reduce the amount of available PA at this level. We found that PDE4A1(PABD) not only exhibited the expected Golgi-like confined localization, but also significantly reduced the number of CgA secretory granules, without affecting CgA expression (Figure 1B). Moreover, expression of PDE4A1(PABD Mut) which does not bind to PA and which was not detected in the Golgi area did not impair the biogenesis of CgA-induced granules (Figure 1B), strongly supporting the crucial role of Golgi PA in the formation of CgA secretory granules.

3.3 | Chromogranin A interacts with PA through a putative PA-binding domain

To characterize the CgA region involved in PA binding, we compared the CgA helicoidal motifs with those of proteins with known PABD, notably the Golgi PA-binding protein PDE4A1. This analysis revealed a potential PABD within residues 352-381 of CgA, a sequence containing positively charged and hydrophobic amino acids (Figure 1C). Indeed, a bioinformatics analysis using Heliquest software33 further refined this PABD to residues 364-381 (Figure 1C), which shares the characteristics of typical PABDs.[34] It is predicted that this PABD adopts an amphipathic α-helical conformation with five positively charged residues (arginines) sequestered in one side of the helix, which could interact with the negatively charged polar head of PA, and three surface exposed hydrophobic residues (tryptophane, phenylalanine, and leucine), on the other side of the helix which could insert within the hydrophobic part of membranes and interact with the fatty acid chains of PA (Figure 1D). Interestingly, a 3D structural model of CgA PABD confirmed that this domain displays an α-helix when its structure was examined using MacPyMol software (shown as a ribbon, Figure 1E). We then used a semi-quantitative in vitro assay with NBD-labeled liposomes[21] to investigate the PA-binding capacity of three different GST fusion proteins containing the C-terminal helicoidal motif of CgA or parts of it: CgA(352-381) (CgA PABD), CgA(352-372) (catestatin), and CgA(373-381). We found that GST-CgA(352-381) very efficiently bound PA-containing liposomes, while the binding of GST-CgA(352-372) was greatly reduced and that of GST-CgA(373-381) was even lower (Figure 1F). In contrast, none of the proteins tested efficiently bound PC NBD-liposomes (Figure 1F), highlighting the preferential affinity of the CgA α-helix for PA, rather than for curved membranes. These data not only indicate that the entire sequence corresponding to CgA PABD is important for PA binding, but also that CgA proteolysis, as it occurs in secretory granules and which generates the peptide catestatin (CgA(352-372)) (Figure 1C), should disrupt this binding.

3.4 | Specific PA species are predominant and common to Golgi and secretory granule membranes from CgA-expressing cells

We analyzed and compared the PA content of Golgi and secretory granule membrane fractions purified from COS7 cells stably expressing CgA (COS7-CgA). These cells display CgA-containing secretory granule-like structures in contrast to their WT counterparts with no CgA.[14,15] The enrichment of secretory granule and Golgi membrane fractions was evaluated by western blotting (Figure S1). Detailed lipidomics analysis of these fractions revealed that over the 44 distinct species detected, only few specific PA species are predominantly identified in secretory granule and Golgi membranes of COS7-CgA cells, that is, PA (36:1), PA (38:2), PA (38:6) and PA (40:6) (Figure 2A). Furthermore, we compared the Golgi membrane of COS7-WT and COS7-CgA cells to examine the potential impact of CgA expression on the PA content. We found that the Golgi membrane of COS7-WT and COS7-CgA cells exhibit the

same predominant PA species, that is, PA (36:1), PA (38:2) and PA (40:6), but we also noticed a significant enrichment in PA (36:1) in Golgi membranes after CgA expression, mainly at the expense of PA (40:6) (Figure 2B). The presence of the same major PA species, namely PA (36:1), PA (38:2), and PA (40:6), was also found in secretory granule membranes isolated from the neuroendocrine PC12 cells (Figure 2C). These data suggest that PA (36:1), PA (38:2), and PA (40:6) could represent crucial species for secretory granule formation.

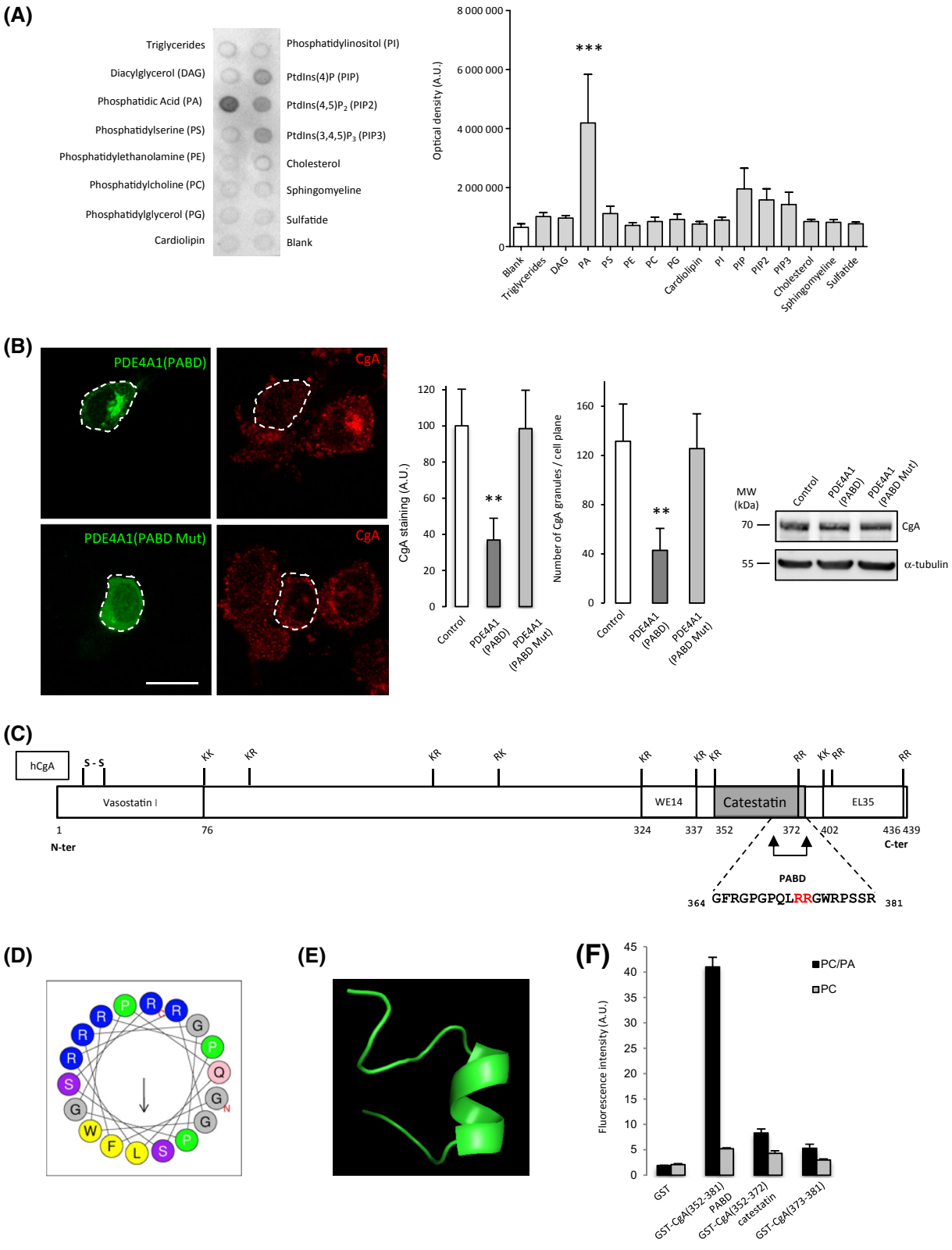


FIGURE 1 CgA interacts with PA through a putative PABD and Golgi PA is involved in CgA secretory granule biogenesis. A, Protein-lipid overlay assay in the presence of recombinant CgA (500 ng/mL) using commercial membrane strips where 100 pmol/spot of the following lipids are adsorbed: triglycerides, diacylglycerol (DAG), phosphatidic acid (PA), phosphatidylserine (PS), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylglycerol (PG), cardiolipin, phosphatidylinositol (PI), phosphatidylinositol 4-phosphate (PI(4)P), phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ($PI(4,5)P_2$), phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate ($PI(3,4,5)P_3$), cholesterol, sphingomyelin, or 3-sulfogalactosylceramide (sulfatide). After the overlay, the membrane was immunostained for CgA using the anti-WE-14 antibody, and revealed using a chemiluminescence kit. Plotted are means of CgA binding intensity expressed as percentage normalized to control (blank) ± SEM (n = 3). ***$P < .001$, (ANOVA) one-way analysis of variance test with Bonferroni's comparison test. B, Involvement of Golgi PA in the formation of CgA-containing secretory granules in PC12 cells. Cells expressing wild-type PDE4A1 coupled with GFP (PDE4A1(PABD)) or PABD-mutated PDE4A1 coupled with GFP (PDE4A1(PABD Mut)) are surrounded by a dashed line. Cells were immunolabeled with anti-CgA antibody and their fluorescence was examined using confocal microscopy. Representative confocal microscopy sections throughout the cells are shown. Values for the intensity of CgA staining and the number of granules per cell are plotted as the means ± SD (n = 2; 40 cells per condition). **$P < .01$, Mann-Whitney test. The scale bar represents 20 μm. Western blots show expression of CgA and α-tubulin as loading control. C, Human CgA (hCgA) sequence showing a region of 18 amino acids (364-381), encompassing a positive charge cluster and hydrophobic residues that could adopt an α-helical conformation, delimited by arrows, suggesting its function as PA-binding domain (PABD). D, PA-binding profile of the putative human CgA PABD. Amphipathic α-helix projection of the core 18 amino acids of the PABD of CgA obtained with Heliquest software. Arrow indicates hydrophobic moment. Red N and C indicate the beginning and the end of PABD amino acid sequence. E, Model of the putative human CgA PABD. Ribbon corresponds to the α-helix. The structure was determined using MacPyMOL (v1.74). F, Characterization of the PA-binding capacity of human CgA through the putative PABD. Semi-quantitative fluorescent liposome assays with fluorescent liposomes (5% PE-NBD, 95% DOPC) or PA-containing fluorescent liposomes (5% PE-NBD, 85% DOPC, 10% PA mix) and GST-CgA-PABD constructs linked to GSH-sepharose beads. The binding of liposomes with CgA-PABD constructs was monitored by fluorimetry. Results are presented as means ± SD (triplicate measurements; n = 3)

3.5 | Chromogranin A interacts with major Golgi/secretory granule PA species included in giant liposomes and induces membrane deformation and vesicle budding

To test the interaction between CgA from COS7-CgA cell extracts and the predominant PA species identified in Golgi and secretory granule membranes, we used a liposome flotation assay (Figure 3A). Following the flotation assay, the different fractions were analyzed by western blotting using a CgA-specific antibody.[25] This analysis revealed a strong interaction between CgA and liposomes enriched with PA species identified previously by lipidomics analysis, with an apparent preference for PA (36:1), and far less interaction with PIP_2-enriched liposomes (Figure 3B). In contrast, no interaction was found with liposomes enriched with PC, PS, or PA (36:0), in accordance with the results obtained using lipid strips (Figures 1B and 3B). These results demonstrate that endogenous CgA interacts specifically with predominant PA species identified in Golgi and secretory granule membranes from CgA-expressing cells.

To examine the membrane dynamics following CgA and PA interaction, we developed a model of GUVs enriched in PA (36:1) or PA (40:6), whose formation is assisted by a polyvinyl alcohol gel. To analyze their morphology using confocal microscopy, we generated PA-enriched GUVs containing a fluorescent lipid, phosphatidylethanolamine (PE)-NBD. After image acquisitions, we observed that the formed GUVs exhibit a diameter ranging between 5 and 50 μm, that the fluorescence is homogeneously distributed around the GUVs and that there are no budding events (Figure 3C; Supporting Information Video 1). Addition of 2 μM of CgA to PA-enriched GUVs provoked a marked fluorescence concentration in confined membrane domains of several GUVs just before budding events which resulted in the formation of small vesicles (Figure 3D; Supporting Information Video 2). Quantification of membrane deformations generating vesicles revealed that the number of budding events depends on CgA concentration (Figure 3E). Finally, to analyze the direct involvement of CgA in GUV membrane remodeling, we generated a CgA fluorescent probe, CgA-Alexa488, and we observed that addition of 2 μM of CgA-Alexa488 on non-fluorescent PA-enriched GUVs results first in a rapid and homogenous fluorescence distribution in GUV membranes, and then, within a minute budding events were detected in fluorescent CgA-enriched membrane domains (Figure 3F). Altogether, these results indicate that CgA interacts with membrane PA and that this interaction could induce a membrane remodeling resulting in vesicle budding.

3.6 | Thermodynamic characteristics of CgA/PA interaction indicate that PA favors CgA incorporation in liposome membranes

To investigate the CgA/PA interaction in more details, we conducted an ITC analysis, which quantifies the binding equilibrium directly by measuring the heat change resulting from the association of a ligand with its binding partner.[35,36] ITC thermograms showed that injection of a water suspension of SUVs composed of 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) or DOPC/PA (36:1) induced an exothermic

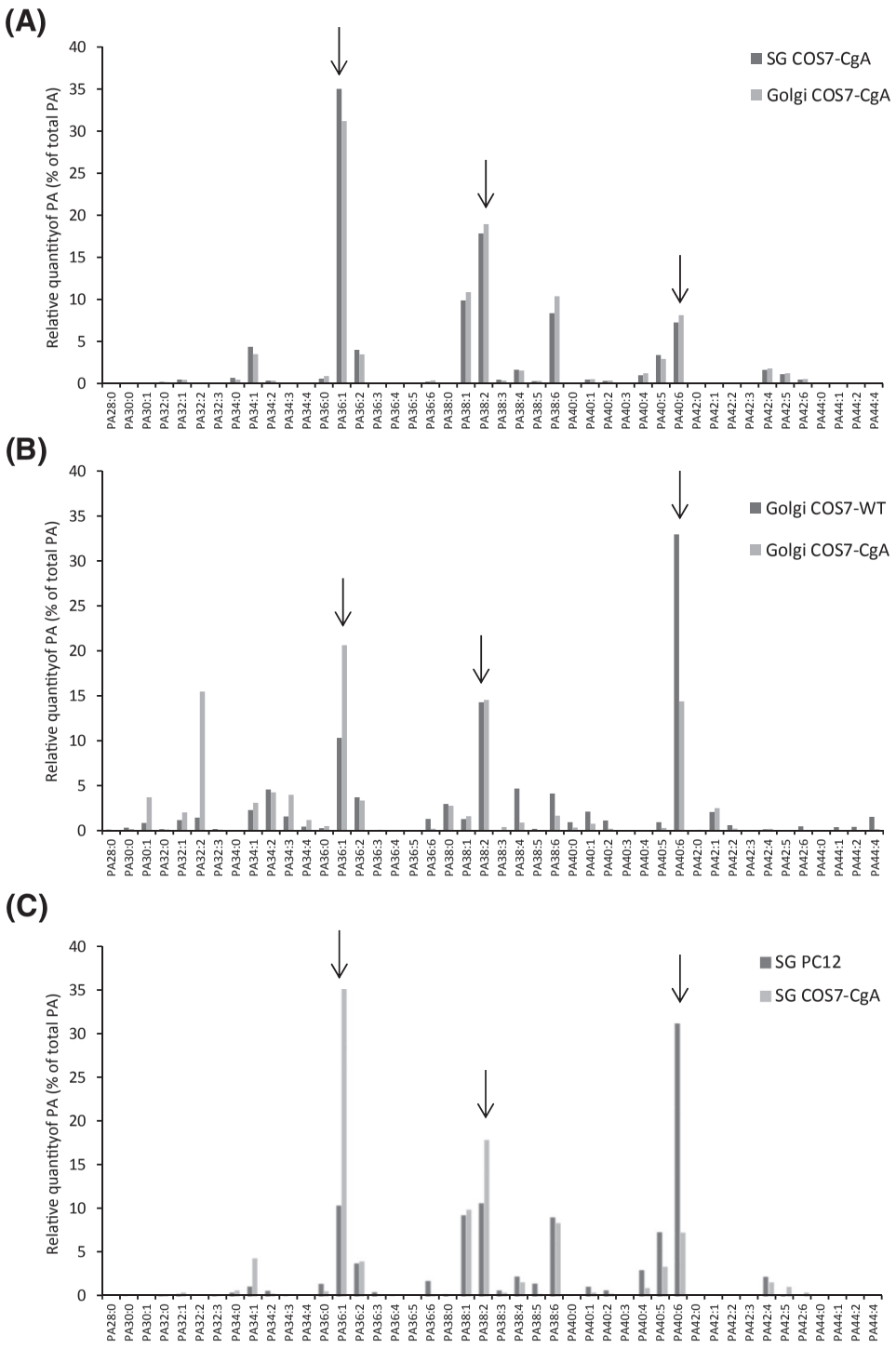


FIGURE 2 Same predominant PA species are found in Golgi and secretory granule membranes from COS7-WT, COS7-CgA, and PC12 cells. A, The level of distinct PA species was measured in fractions of secretory granule (SG) and Golgi membranes from COS7-CgA cells by duplicate UPLC/MS/MS analysis of two samples (each containing 200 μg of protein) from each fraction. The acyl chain composition of each species is shown on the *x* axis. The *y* axis shows the abundance of each species as a percentage of total PA in the sample. B, PA levels were measured in fractions of Golgi membranes from COS7-WT or COS7-CgA cells by duplicate UPLC/MS/MS analysis of two samples (each containing 200 μg of protein) from each fraction. The acyl chain composition of each species is shown on the *x* axis. The *y* axis shows the abundance of each species as a percentage of total PA in the sample. C, PA levels were measured in secretory granule-containing fractions from PC12 or COS7-CgA cells by duplicate UPLC/MS/MS analysis of two samples (each containing 200 μg of protein) from each fraction. The acyl chain composition of each species is shown on the *x* axis. The *y* axis shows the abundance of each species as a percentage of total PA in the sample

process resulting from the dilution process of SUVs in water (Figure 4A,B, upper panels). When we injected DOPC or DOPC/PA (36:1) SUV suspension into a CgA solution, the ITC results showed sequential exothermic and endothermic processes (Figure 4A,B, lower panels). Enthalpy curves (Figure 4C) were obtained from the integrated energy values obtained from A and B traces in lower panels, using A and B traces in upper panels as blank, respectively. These curves were fitted using two simple one-site binding model to yield thermodynamic parameters (Table 1). Comparing the enthalpy curves obtained after DOPC and DOPC/PA (36:1) injection in CgA solution, we observed an increase due to an exothermic process related to the binding of CgA with DOPC that could result from hydrogen bonding and/or electrostatic force.[18] We also noticed that the maximum of enthalpy is reached after 14 injections of DOPC SUVs while it is reached only after 6 injections of DOPC/PA (36:1) SUVs (Figure 4C). In addition, for the exothermic process, the

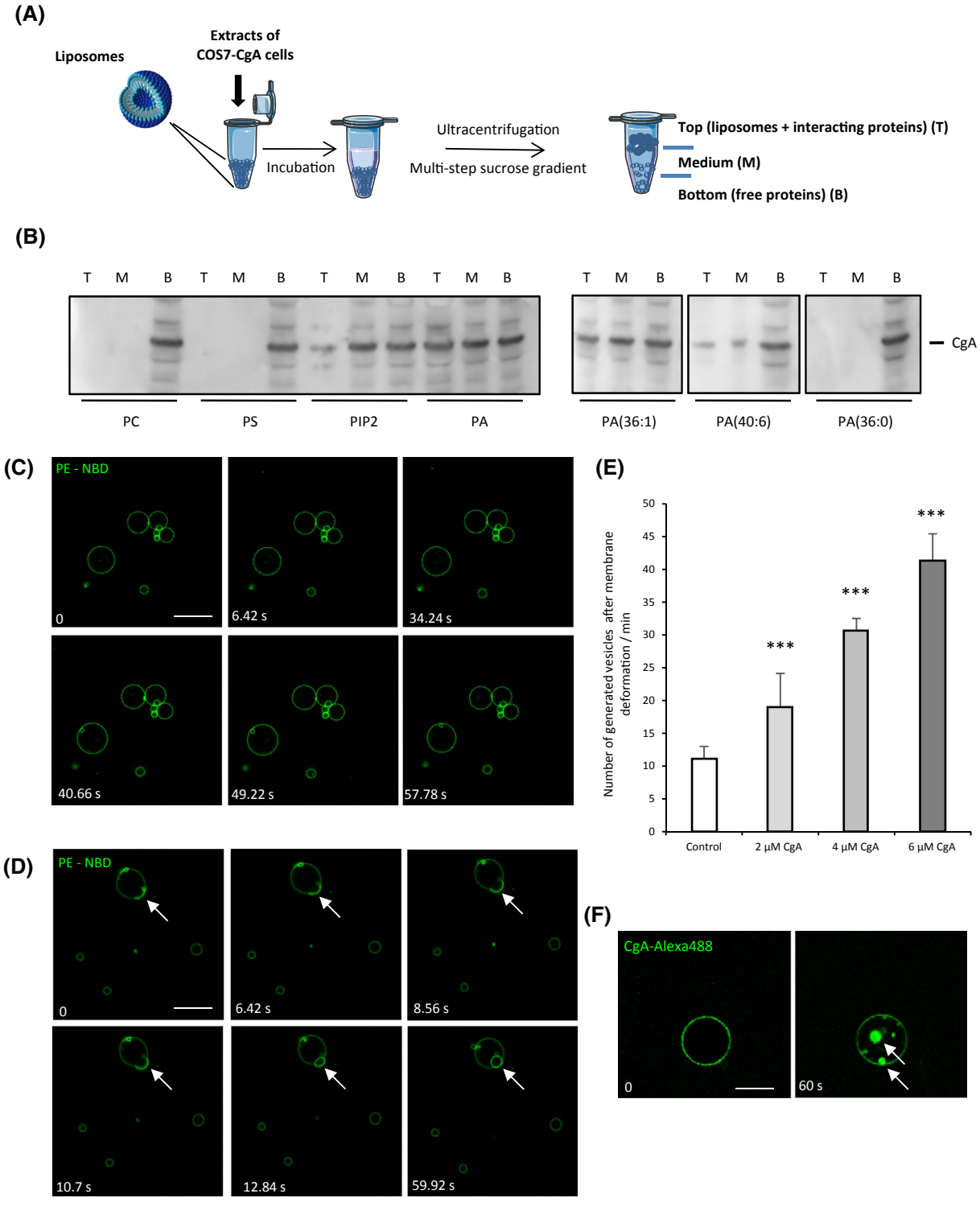


FIGURE 3 CgA interacts with PA species identified in Golgi and secretory granule membranes and provokes membrane deformation of PA-enriched GUVs. A, Schematic representation of the liposome flotation assay approach used to study the interaction of CgA from COS7-CgA cell extracts with PA species. B, Detection of CgA in the different fractions (Top (T), Medium (M), Bottom (B)) obtained from liposome assays. COS7-CgA cell extracts were incubated with liposomes containing 5% of PE-NBD, 85% of DOPC, and 10% of the indicated phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2), a commercial phosphatidic acid mix (PA) or distinct species of PA (PA(36:0), PA(36:1) or PA(40:6)). Thirty μg of protein from each fraction were run on SDS-PAGE and immunoblotted with the WE-14 antibody. C, Formation of fluorescent PA-containing GUVs by PVA-assisted swelling. Stable fluorescent GUVs (95% DOPC, 4% PA(36:1), and 1% PE-NBD) were generated and observed by live confocal microscopy during 1 min. Representative confocal microscopy sections throughout the GUVs are shown. The scale bar represents 30 μm. D, Effect of CgA on fluorescent PA-containing GUVs. Fluorescent GUVs (95% DOPC, 4% PA(36:1) or PA(40:6), and 1% PE-NBD) were incubated with 2 μM of CgA. Deformation of GUV membrane (arrows) was observed by live confocal microscopy during 1 min. Representative confocal microscopy sections throughout the GUVs are shown. The scale bar represents 30 μm. E, Quantification of generated vesicles following membrane deformation of PA-containing GUVs. GUVs (95% DOPC, 4% PA(36:1), and 1% PE-NBD) were incubated with 2, 4, and 6 μM of CgA (n = 3; 35 videos per condition). ***$P < .001$, Mann-Whitney test. Means ± SEM are plotted. F, Distribution of CgA-Alexa488 on PA-containing GUVs. GUVs (96% DOPC, 4% PA(36:1)) were incubated with 2 μM of CgA-Alexa488. Staining and budding (arrows) of GUV membrane was observed by live confocal microscopy during 1 min. Representative confocal microscopy sections throughout the GUVs are shown. The scale bar represents 20 μm

calculated enthalpy ratio $\Delta H^{exo}_{DOPC/PA(36:1)}/\Delta H^{exo}_{DOPC}$ is close to 7, the enthalpy ratio $\Delta H^{endo}_{DOPC/PA(36:1)}/\Delta H^{endo}_{DOPC}$ is equal to 12, and the stoichiometry (n) for both processes is lower with DOPC/PA (36:1) SUVs (Table 1). Moreover, the endothermic phase leads to enthalpy decrease (Figure 4C) and the stoichiometric ratio, which is the ratio between the total number of lipids and the number of lipids on the outer surface of the SUV, is close to 1.8, suggesting a reorganization of the protein/lipid complex in the SUV membrane. Together, these results clearly show that PA favors the incorporation of CgA in the SUV membrane.

3.7 | Chromogranin A induces the remodeling of supported membrane bilayers enriched with Golgi/secretory granule PA

Using atomic force microscopy (AFM), we studied the impact of CgA on supported bilayers composed of DOPC or DOPC/PA (36:1). Addition of 0.6 or 1.2 μM of CgA during 15 minutes (T1) and 75 minutes (T2) on DOPC membranes revealed small alterations of their topographical profile corresponding to protrusions with a maximal height of 4 nm (Figure 5A). In contrast, addition of 0.6 or 1.2 μM of CgA on DOPC/PA (36:1) membranes led to local profile changes of the membrane with a height of the protrusions above 4 and 16 nm, respectively (Figure 5B). Of note, the grain size analysis of 11-15 images obtained with 1.2 μM of CgA during 75 minutes revealed that the total number of CgA-induced domains increases by a factor of 3 after PA (36:1) addition in DOPC bilayers (41 ± 23 domains per 100 μm^2 DOPC bilayer (Figure 6A) vs 120 ± 41 domains per 100 μm^2 DOPC/PA (36:1) bilayer (Figure 6B)). Moreover, domains with an area greater than 20 μm^2 were clearly more abundant in presence of PA (36:1) in the supported bilayer, and their height increased with their area to reach a mean of 21 ± 3 nm (Figure 6B). These results suggest that CgA interacts with PA-enriched lipid bilayers and that this interaction modifies membrane topology, in a concentration and time-dependent manner.

3.8 | Chromogranin A PABD is required for secretory granule biogenesis

To analyze the role of the predicted CgA PABD in the formation of secretory granules, we expressed CgA where the PABD was deleted (CgAΔPABD-GFP) in COS7 and AtT20 cells. This specific CgA alteration significantly reduced secretory granule formation as compared to native CgA (Figure 7A,B). Indeed, although CgAΔPABD-GFP and CgA-GFP both colocalized with the Golgi marker GM130, the number of CgA positive granules not only is reduced when the PABD is deleted from CgA in COS7 cells (Figure 7A), but also in ATt20 cells although transfection efficiency was lower (Figure 7B). Using deconvoluted *g*CW STED nanoscopy to overcome the noise at the Golgi level (Figure S2), we confirmed a reduction of CgA-containing structures in the Golgi area of both cell types expressing CgAΔPABD-GFP (Figure 7C,D). Altogether, these results support the idea that the interaction of CgA with PA through its PADB is important for granule biogenesis.

3.9 | Inhibition of PLD-mediated PA synthesis alters the biogenesis of secretory granules

To study the implication of PA in Golgi membranes during the biogenesis of CgA-containing secretory granules, we altered PLD-mediated PA synthesis since PLD appears to be the most important provider of PA in the Golgi.[37] First,

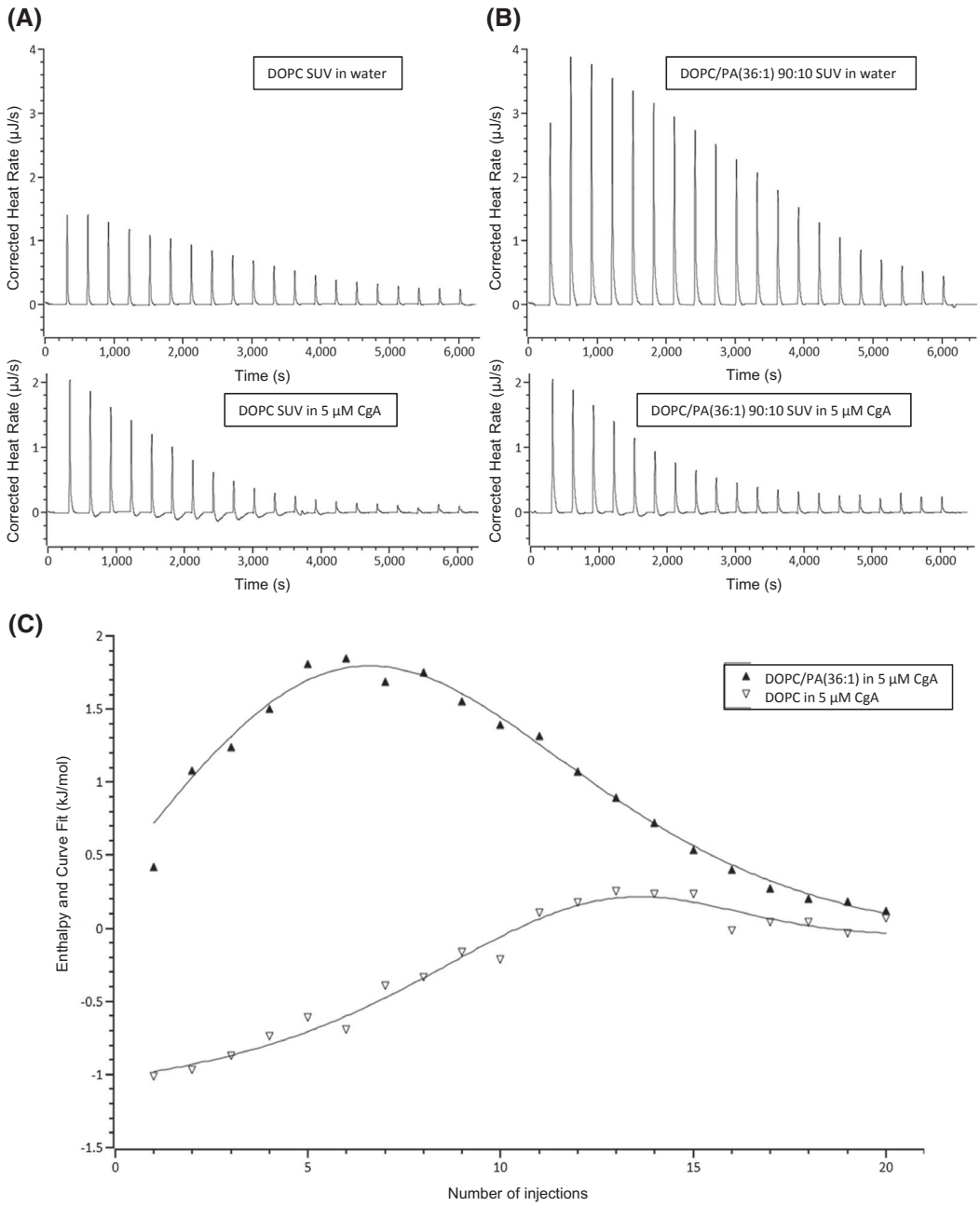


FIGURE 4 ITC analysis reveals that PA favors membrane incorporation of CgA. A, DOPC SUVs and CgA binding measured by titrating 5 µM of CgA in the chamber with 10 mM vesicle suspension in the syringe. Top panel, raw heating power over time obtained with DOPC SUV injection in water; bottom panel, raw heating power over time obtained with DOPC SUV injection in CgA solution. B, DOPC/PA(36:1) SUVs and CgA binding measured by titrating 5 µM of CgA in the chamber with 10 mM vesicle suspension in the syringe. Top panel, raw heating power over time obtained with DOPC/PA(36:1) SUV injection in water; bottom panel, raw heating power over time obtained with DOPC/PA(36:1) SUV injection in CgA solution. C, Fit curves of the integrated energy values obtained from A and B traces in bottom panels using A and B traces in top panels as blank, respectively. Experiments were carried out at 10°C, and each value is the mean of three independent titrations

secretory cells were incubated with the PLD pan-inhibitor 5-Fluoro-2-indolyl des-chlorohalopemide (FIPI), which provoked a significant reduction in the number of CgA-containing granules in COS7-CgA cells (Figure 8A) and a smaller reduction in PC12 cells (Figure 8B), without any apparent effect on the levels of three major granins (CgA, CgB, SgII). Interestingly, in chromaffin cells obtained from mice lacking *Pld1* gene (*Pld1*$^{-/-}$), we observed by electron microscopy a significant reduction in the number of secretory granules (Figure 8C,D), associated to a decrease in their dense core diameter (Figure 8C,E). Thus, pharmacological and genetic invalidation of PLD activity and expression supported the notion that PLD1 is an important provider of PA in Golgi membranes,[38] and showed that PLD1-generated PA

TABLE 1 Thermodynamic parameters for CgA binding on DOPC and DOPC/PA(36:1) SUVs. The values are plotted in Figure 4C

	DOPC		DOPC/ PA(36:1)	
	Exothermic	**Endothermic**	**Exothermic**	**Endothermic**
Kd (M)	$1.5\ 10^{-4} \pm 0.5\ 10^{-4}$	$2\ 10^{-5} \pm 1\ 10^{-5}$	$1.16\ 10^{-3} \pm 0.03\ 10^{-3}$	$3\ 10^{-4} \pm 0.1\ 10^{-4}$
n	259 ± 30	460 ± 40	199 ± 5	355 ± 5
ΔH (kJ/mol)	-1.82 ± 0.09	0.640 ± 0.06	-12.9 ± 0.3	7.65 ± 0.15
ΔS (J/mol.K)	67.3 ± 3.2	93.4 ± 4.8	10.6 ± 1.3	94.5 ± 0.8

Note: Experiments were carried out at 10°C, and each value is the mean ± standard deviation from the fitted data of three independent experiments. Kd, dissociation constant; n, number of binding sites; ΔH, enthalpy change; ΔS, entropy change.

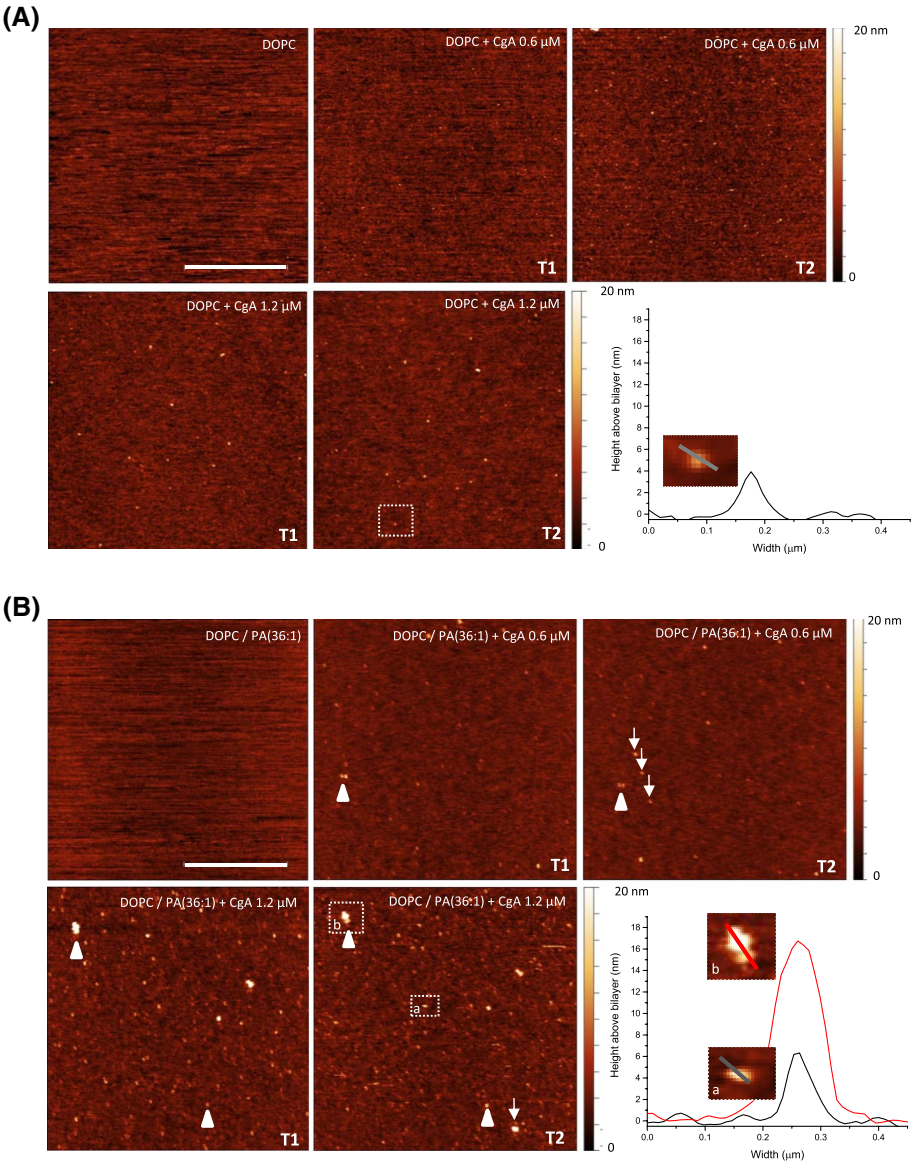


FIGURE 5 CgA induces the remodeling of PA-enriched membrane bilayers. A, Atomic force microscopy topographical images of mica supported bilayer surfaces from DOPC GUVs, incubated without or with 0.6 and 1.2 µM of CgA, during 15 min (T1) and 75 min (T2). The scale bar represents 2 µm. The scheme corresponds to a topographical profile through an aggregate (enlarged view) showing a difference of height of 6 nm with the continuous phase. B, Atomic force microscopy topographical images of mica supported bilayer surfaces from DOPC/PA(36:1) (9:1, mol ratio) GUVs, incubated without or with 0.6 and 1.2 µM of CgA, during 15 min (T1) and 75 min (T2). Arrow heads indicate aggregates that appeared at T1 and are maintained at T2; arrows indicate aggregates that appeared between T1 and T2. The scale bar represents 2 µm. The scheme corresponds to topographical profiles through aggregates (enlarged views) showing a difference of height of 6 nm (a) and 17 nm (b) with the continuous phase

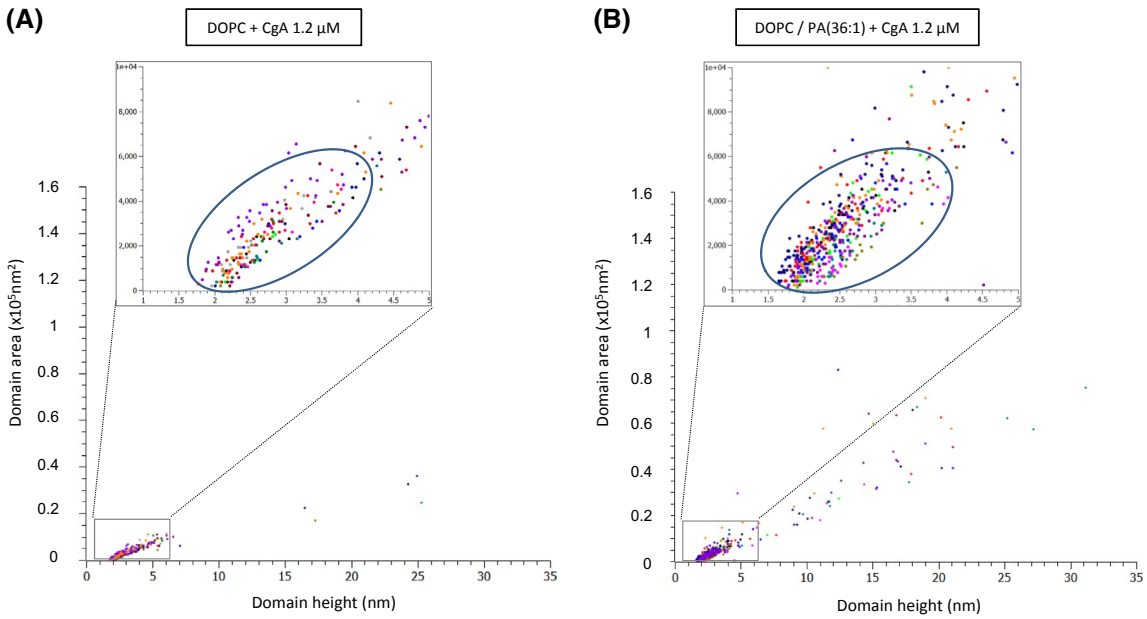


FIGURE 6 Number, surface and height of CgA-induced domains depend on PA enrichment of membrane bilayers. A, Scatter plot showing the number, area, and height of domains obtained after incubation of supported bilayer surfaces from DOPC GUVs with 1.2 µM of CgA during 75 min. Insert corresponds to enlarged view of the delimited zone emphasizing domains with height below 4 nm and area below 6000 nm^2 (within blue surrounded zone). Analysis of domains was performed on 15 images and domains detected on an image are of the same color. B, Scatter plot showing the number, area, and height of domains obtained after incubation of supported bilayer surfaces from DOPC/PA(36:1) (9:1, mol ratio) GUVs with 1.2 µM of CgA during 75 min. Insert corresponds to enlarged view of the delimited zone emphasizing domains with height below 4 nm and area below 6,000 nm^2 (within blue surrounded zone). Analysis of domains was performed on 11 images and domains detected on an image are of the same color

is required for the biogenesis of secretory granules containing CgA.

4 | DISCUSSION

Although considerable efforts have been deployed to identify the molecular mechanism at the origin of secretory granule formation, many aspects of this fundamental process remain to be elucidated. The biogenesis of secretory granules depends on TGN membrane dynamics that rely on interactions of cytosolic and luminal proteins with molecular components of the TGN membrane. Among TGN luminal proteins, members of the granin protein family have been long considered as major actors of secretory granule biogenesis but direct mechanistic evidence is still lacking.[39]

Here, we first uncovered the ability of the coiled-coil glycoprotein CgA to bind acidic phospholipids, in particular PA, using a lipid overlay assay. Since PA was suspected to play a role in secretory granule biogenesis,[40] we overexpressed the cytosolic phosphodiesterase PDE4A1, a *bona fide* PA-binding protein in Golgi membranes characterized previously[21] to test this possibility. We observed a decrease in the number of CgA-containing secretory granules in PC12 cells in the presence of PDE4A1-PABD, presumably acting as a competitor for endogenous PA, suggesting that luminal CgA requires TGN membrane PA to generate secretory granules. As most enzymes involved in PA synthesis are found in the cytoplasmic leaflet of intracellular membranes, it is expected that most PA is generated in these membrane cytosolic leaflets. However, passive PA flip/flop or active PA-transfer by flippase, floppase, and scramblase could efficiently alter this transbilayer asymmetry for PA. Accordingly, we observed that PA was readily detected on the inner leaflet of the plasma membrane of PC12 cells expressing the PA-binding protein sporulation-specific protein 20 (Spo20p)-GFP less than 1 minute after cell incubation with 10µM of PA micelles (unpublished observation). Additionally, in vitro experiments have suggested that intrinsic flipping of PA is affected by various parameters including pH and the geometry of specific PA species.[41,42] Thus, it is likely that significant levels of PA are present in the luminal leaflet of the TGN, and therefore, CgA/PA interaction could be effective at this location.

In silico identification of the CgA(364-381) sequence as a PABD further supported the possibility of CgA/PA interaction, which was confirmed using PA-enriched liposomes, as this sequence specifically binds PA. Interestingly, CgA PABD binds PA at a level similar to that observed for PDE4A1. In contrast, shorter fragments, corresponding to the expected cleavage of CgA occurring during secretory granule maturation to generate catestatin, exhibited only a weak interaction

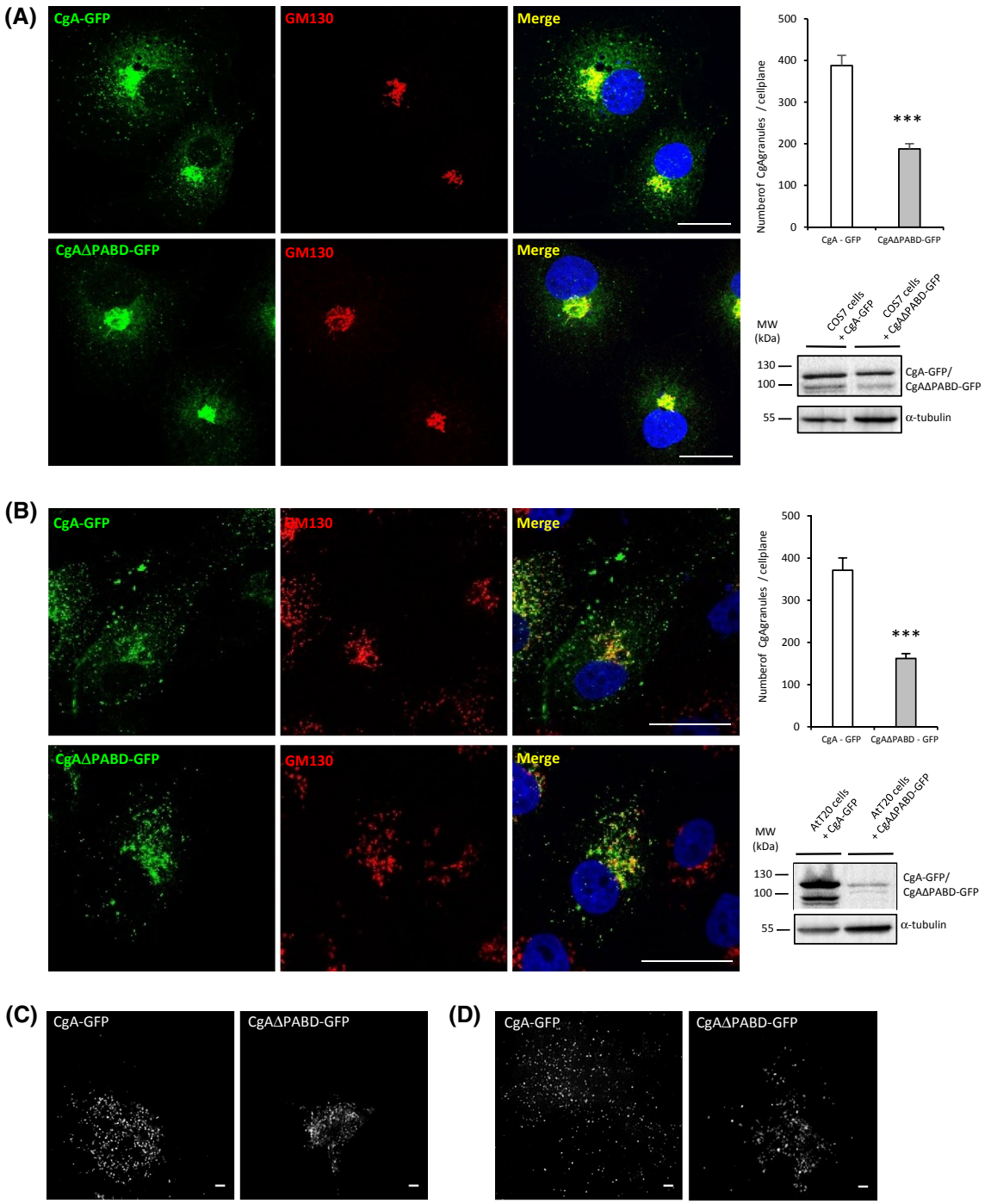


FIGURE 7 CgA PABD is required for secretory granule biogenesis. A, COS7 cells transfected with plasmids encoding full-length CgA-GFP or CgA PABD-mutated form (CgAΔPABD)-GFP were examined for GFP fluorescence and GM130 immunoreactivity using confocal microscopy. Representative confocal microscopy sections throughout the cells are shown and were used to quantify automatically the granules with a diameter > 200 nm. Values for the number of granules/cell are plotted as the means ± SEM (n = 3; 65 cells per condition). ***$P < .001$, Mann-Whitney test. The scale bar represents 20 μm. Western blots show expression of CgA-GFP or CgAΔPABD-GFP fusion proteins and α-tubulin as loading control. B, AtT20 cells transfected with plasmids encoding full-length CgA-GFP or CgA PABD-mutated form (CgAΔPABD)-GFP were examined for GFP fluorescence and GM130 immunoreactivity using confocal microscopy. Representative confocal microscopy sections throughout the cells are shown and were used to quantify automatically the granules with a diameter > 200 nm. Values for the number of granules/cell are plotted as the means ± SEM (n = 3; 70 cells per condition). ***$P < .001$, Mann-Whitney test. The scale bar represents 20 μm. Western blots show expression of CgA-GFP or CgAΔPABD-GFP fusion proteins and α-tubulin as loading control. C, Golgi area of COS7 cells transfected with plasmids encoding full-length CgA-GFP or CgA PABD-mutated form (CgAΔPABD)-GFP was examined for GFP fluorescence using *g*CW STED. Representative sections are shown after deconvolution. The scale bar represents 1 μm. D, Golgi area of AtT20 cells transfected with plasmids encoding full-length CgA-GFP or CgA PABD-mutated form (CgAΔPABD)-GFP was examined for GFP fluorescence using *g*CW STED. Representative sections are shown after deconvolution. The scale bar represents 1 μm

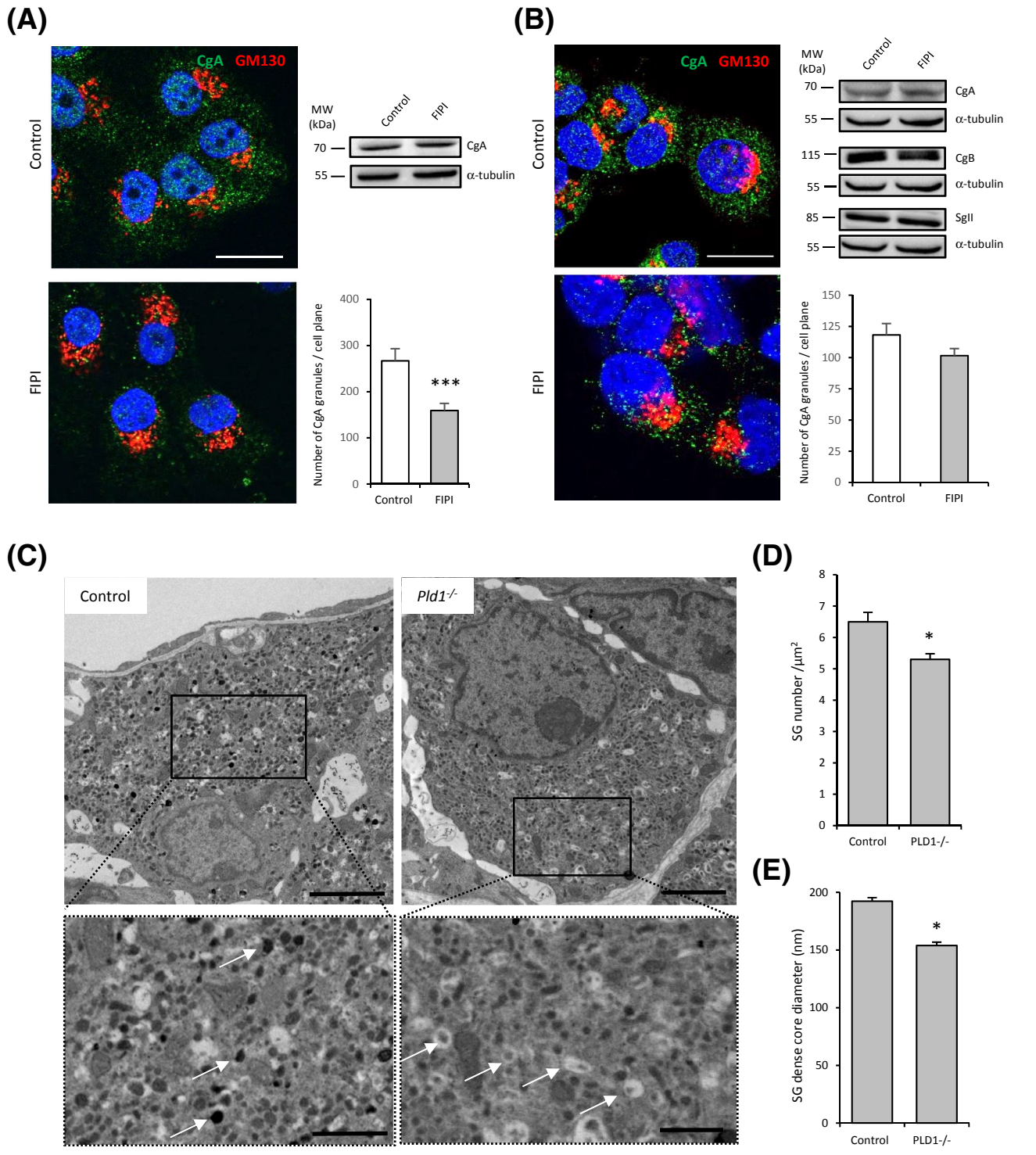


FIGURE 8 Inhibition of PLD-mediated PA synthesis alters secretory granule biogenesis. A, COS7-CgA cells were treated or not with 75 nM FIPI for 6 h, fixed and immunolabeled with anti-GM130 and anti-CgA antibodies. Representative confocal microscopy sections throughout the cells are shown. The scale bar represents 20 µm. Values for the number of CgA secretory granules are plotted as the means ± SEM. (n = 3; 60 cells per condition). ***$P < .001$, Mann-Whitney test. Western blots show expression of CgA and α-tubulin as loading control. B, PC12 cells were treated or not with 75 nM FIPI for 6 h, fixed and immunolabeled with anti-GM130 and anti-CgA antibodies. Representative confocal microscopy sections throughout the cells are shown. The scale bar represents 10 µm. Values for the number of CgA secretory granules are plotted as the means ± SEM. (n = 3; 60 cells per condition). Mann-Whitney test. Western blots show expression of CgA, CgB, and SgII proteins, and α-tubulin as loading control. C, Electron microscopy analysis of chromaffin cells from WT (control) and $Pld1^{-/-}$ mice. White arrows indicate representative secretory granules. The scale bars represent 2 µm. D, Quantification of the number of secretory granules (SG) shown in panel (A) (n = 6 mice per condition; 50 cells per mouse adrenal medulla). *$P < .05$, Mann-Whitney test. Means ± SEM are plotted. E, Quantification of the dense core diameter of secretory granules (SG) shown in panel (A) (n = 6 mice per condition; 950 granules). *$P < .05$, Mann-Whitney test. Means ± SEM are plotted

with PA. We can therefore anticipate that CgA/PA interaction might be regulated during secretory granule maturation and CgA processing. It is tempting to speculate that CgA and PA interact early in the TGN to trigger secretory granule formation, but that this interaction is disrupted later by proteolysis after budding to generate catestatin and to ensure secretory granule homeostasis. Such a sequential role has previously been demonstrated for the granin 7B2 in the regulation of the proteolytic enzyme PC2 and hormone sorting and secretion in endocrine cells.43 Moreover, the CgA PABD sequence may allow hydrophobic residue insertion into lipid bilayers and direct ionic interaction between basic residues and several PA molecules. Thus, CgA may participate to TGN remodeling by interacting with TGN predominant PA species that could induce the formation of PA-enriched microdomains. Indeed, CgA represents 40% to 80% of the protein content of secretory granules in chromaffin cells and the concentration is in the order of millimolar, representing around 5000 CgA molecules per granule.[44,45] On the contrary, molecular dynamic simulation of the interaction of PA with the yeast protein Spo20p PABD revealed that up to 6 PA molecules bind to one Spo20p molecule.[46] Based on the number of positively charged residues in the CgA PABD, it is possible that one CgA binds and sequesters up to 5 PA. Therefore, this can yield an extremely high density of PA, with up to 25 000 molecules accumulating with CgA on specific locations of the inner leaflet of the TGN membrane. Accumulation of the conical-shaped PA enables membrane bending,[47] and this phenomenon could generate TGN membrane curvature preceding secretory granule budding.

To further support the role of PA in secretory granule formation, we analyzed and compared the PA composition in Golgi and secretory granule membranes from COS7-CgA cells by mass spectrometry, and found a strong similarity in the PA species present in the membranes of these two compartments. Among these PA species, we observed a predominance of several common mono- and poly-unsaturated forms, that is, PA (36:1) and PA (40:6). Interestingly, these PA species were also identified in the membrane of secretory granules from neuroendocrine PC12 cells, suggesting that specific PA species occur at the Golgi membrane of CgA-expressing cells to induce the biogenesis of secretory granules, and that one or some of these species have a key role in this process. Using liposome models enriched with distinct phospholipids, we observed that CgA preferentially interacts with PA (36:1) and PA (40:6), and that addition of this granin generates deformation of PA (36:1)- or PA (40:6)-enriched artificial membranes in a dose-dependent manner. Of note, budding occurs in an outward direction from PA-enriched giant liposome membrane toward CgA, contrasting with the required budding toward the cytosol required for secretory granule formation. This apparent discrepancy is probably due to the fact that native membranes are more complex than artificial membranes in terms of lipid variety and asymmetric distribution between the two leaflets, in addition to the presence of other membrane proteins and the impact of cytosolic and luminal membrane environment (pH, ion concentration, cytosolic proteins). The hydrophobic face of CgA PABD helix was proposed to partially insert into artificial membrane, stressing nearby lipid packing, creating local defects, and promoting membrane curvature. In any case, the fact that generated buds stay attached to the GUV surface is consistent with the absence of cytosolic proteins involved in vesicle fission, such as dynamin. The analysis of the thermodynamic characteristics of CgA/PA (36:1) interaction by ITC consolidated the observation that CgA strongly interacts with PA (36:1)-enriched membranes to promote membrane deformation. Atomic force microscopy on supported membrane bilayers revealed that PA (36:1) enrichment increased the number, the height, and the surface of CgA-induced domains resulting from either CgA aggregation, membrane deformation, microdomain formation, or any combination of these. These data support a central role for PA in the formation of CgA-induced domains as observed by confocal microscopy and ITC. Altogether, these results are in line with the idea that CgA/PA (36:1) or PA (40:6) interaction could play a key role in the membrane remodeling process necessary for secretory granule budding.

In accordance, we showed that expression of CgA deprived from its PABD leads to a significant decrease not only in the number of CgA granules, with a reduction of CgA granule number in whole cell, but also in the Golgi area. The CgA-PABD deletion mutant is apparently acting as a negative-dominant impairing CgA-induced granule formation, probably by disrupting the molecular interactions normally occurring between CgA and PA at Golgi membranes. Therefore, these data support the notion that CgA PABD is involved in granule biogenesis and that CgA/PA interaction through this domain is critical for the initiation of the secretory process in neuroendocrine cells. Interestingly, the C-terminal sequence of catestatin (CgA(352-372)) including the PABD contains several single-nucleotide polymorphisms associated with metabolic and cardiovascular disorders in humans,[48,49] suggesting a potential link between the onset of these diseases and the disruption of hormone release related to an alteration of CgA secretory granule biogenesis.

Moreover, several studies demonstrated that the enzymatic activity of PLD1 converting PC to PA is an important source of Golgi PA,[38] which is not only required for secretory granule budding,[50] but also involved in secretory granule fusion with the plasma membrane.[51] Pharmacological inhibition of PLD in COS7-CgA and PC12 cells, and *Pld1* knockout in mouse chromaffin cells, both reduced secretory granule biogenesis. The smaller reduction in PC12 could be due to the endogenous expression of additional granin family members endowed with a granulogenic effect and which could act

through PLD/PA-independent manner. Interestingly, this reduction in secretory granule number was also accompanied by an alteration in the shape of these organelles, very similarly to what was found in CgA-knockout chromaffin cells,[52] indicating that PLD1 depletion partially phenocopies CgA deficiency regarding the impact on secretory granule biogenesis. These observations strongly suggest again that CgA and PLD1-generated PA cooperate to trigger the formation of secretory granules in neuroendocrine cells.

Finally, it must be pointed out that a recent study based on in vitro reconstitution assays and molecular modeling reported additional functions of specific species of PA during COPI vesicle fission.[53] Indeed, PA generated by lysophosphatidic acid acyltransferase type gamma promotes the early stage of COPI vesicle fission, whereas PA generated by PLD type 2 promotes the late stage of fission. Intriguingly, PA with shorter fatty acid chains better supported the later function of PA, most likely by triggering the activity of BARS.[53] It is of note that our lipidomic analysis indicates that these shorter forms of PA are scarce in Golgi or secretory granule membranes suggesting that only a tiny fraction of PA could trigger the fission of budding vesicle, while larger proportion of PA is required for budding. A recent study revealed that PI4P in the cytosolic leaflet of the TGN membrane recruits cytosolic proteins such as GOLPH3 through its membrane curvature ability,[54] suggesting that PA could also initiate this process by activating Golgi PIP-kinase to produce PI4P in the cytosolic leaflet.

Altogether, our data show that CgA binds to specific species of PA which in turn could act as lipid cofactors[55] at the TGN to induce membrane remodeling and curvature in order to initiate secretory granule budding, concomitantly or prior to the recruitment of cytosolic proteins such as GOLPH3,[54] arfaptins,[56,57] the actomyosin 1b complex,[58] or the membrane-associated myristoylated protein HID1,[59] but also small GTPase of the Arf family,[60] all of which are also essential actors in this fundamental biological process necessary for regulated secretion. Further studies are now needed to evaluate the connection of CgA/PA interaction with the additional machinery involved in secretory granule biogenesis, in living neuroendocrine cells, and the potential implication of this interaction in diseases related to hormone secretion deregulation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jérôme Leprince for fruitful discussion for PABD modelization. This work was supported by institutional funding from INSERM, University of Rouen-Normandie, IBiSA, IRIB, Région Normandie, the European Regional Development Funds (ERDF DO-IT2015 and ERDF – PACT-CBS programs), and grant from the Medical Research Foundation (FRM) (project number DEI20151234424) to MM-H, P-YR and NV. OC and CD-D were supported by fellowships from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. FL is co-supported by European Union and Région Normandie. LR was supported by fellowship from FRM. Lipidomic analyses were performed on the Bordeaux Metabolome Facility-MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that no competing interests exist.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

O. Carmon, F. Laguerre, and L. Riachy designed and performed most of the experiments, analyzed the data, and contributed to writing of the paper; C. Delestre-Delacour: performed and analyzed lipid overlay assays; Q. Wang performed some immunofluorescence and electron microscopy experiments and associated quantifications; E. Tanguy and T. Thahouly performed the experiments related to liposome flotation and binding assays; L. Jeandel managed cell line culture and secretion experiments; D. Cartier contributed to CgA-GFP and CgAΔPABD-GFP cloning; A.-M. Haeberlé performed electron microscopy experiments and associated quantifications; L. Fouillen performed the lipidome analysis using LC-MS/MS; O. Rezazgui, A. Haefelé, and P.-Y. Renard produced CgA coupled to Alexa Fluor 488 dye; D. Schapman and L. Galas performed super-resolution observations using STED nanoscope; Y. Goumon synthesized recombinant CgA; S. Alexandre designed AFM and ITC setup, and analyzed AFM and ITC data; N. Vitale designed liposome flotation and binding assays, analyzed data from electron microscopy experiments, performed PA-binding domain prediction, and contributed to writing of the paper; Y. Anouar contributed to experiment design, data analysis and interpretation, and writing of the paper; M. Montero-Hadjadje coordinated the study, designed, analyzed and interpreted data, and wrote the paper.

REFERENCES

1. Tanguy E, Carmon O, Wang Q, et al. Lipids implicated in the journey of a secretory granule: from biogenesis to fusion. *J. Neurochem*. 2016;137:904-912.
2. Holthuis JCM, Menon AK. Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature*. 2014;510:48-57.
3. Surma MA, Klose C, Simons K. Lipid-dependent protein sorting at the trans-Golgi network. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2012;1821:1059-1067.
4. Dhanvantari S, Arnaoutova I, Snell CR, et al. Carboxypeptidase E, a prohormone sorting receptor, is anchored to secretory granules via a C-terminal transmembrane insertion. *Biochemistry*. 2002;41:52-60.
5. Gondré-Lewis MC, Petrache HI, Wassif CA, et al. Abnormal sterols in cholesterol-deficiency diseases cause secretory granule malformation and decreased membrane curvature. *J. Cell Sci*. 2006;119:1876-1885.

6. Duran JM, Campelo F, van Galen J, et al. Sphingomyelin organization is required for vesicle biogenesis at the Golgi complex. *EMBO J*. 2012;31:4535-4546.
7. Makowski SL, Kuna RS, Field SJ. Induction of membrane curvature by proteins involved in Golgi trafficking. *Adv Biol Regul*. 2020;75:100661.
8. Montero-Hadjadje M, Vaingankar S, Elias S, Tostivint H, Mahata SK, Anouar Y. Chromogranins A and B and secretogranin II: evolutionary and functional aspects. *Acta Physiol*. 2008;192:309-324.
9. Chanat E, Huttner WB. Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the trans-Golgi network. *J Cell Biol*. 1991;115:1505-1519.
10. Kim T, Tao-Cheng JH, Eiden LE, Loh YP. Chromogranin A, an "on/off" switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. *Cell*. 2001;106:499-509.
11. Elias S, Delestre C, Courel M, Anouar Y, Montero-Hadjadje M. Chromogranin A as a crucial factor in the sorting of peptide hormones to secretory granules. *Cell Mol Neurobiol*. 2010;30:1189-1195.
12. Mahapatra NR, O'Connor DT, Vaingankar SM, et al. Hypertension from targeted ablation of chromogranin A can be rescued by the human ortholog. *J Clin Invest*. 2005;115:1942-1952.
13. Bandyopadhyay GK, Mahata SK. Chromogranin A regulation of obesity and peripheral insulin sensitivity. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:20.
14. Montero-Hadjadje M, Elias S, Chevalier L, et al. Chromogranin A promotes peptide hormone sorting to mobile granules in constitutively and regulated secreting cells. Role of conserved N- and C-terminal peptides. *J Biol Chem*. 2009;284:12420-12431.
15. Elias S, Delestre C, Ory S, et al. Chromogranin A induces the biogenesis of granules with calcium- and actin-dependent dynamics and exocytosis in constitutively secreting cells. *Endocrinology*. 2012;153:4444-4456.
16. Kang YK, Yoo SH. Identification of the secretory vesicle membrane binding region of chromogranin A. *FEBS Lett*. 1997;404:87-90.
17. Abbineni PS, Bittner MA, Axelrod D, Holz RW. Chromogranin A, the major lumenal protein in chromaffin granules, controls fusion pore expansion. *J Gen Physiol*. 2019;151:118-130.
18. Blois A, Holmsen H, Martino G, Corti A, Metz-Boutigue MH, Helle KB. Interactions of chromogranin A-derived vasostatins and monolayers of phosphatidylserine, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. *Regul Pept*. 2006;134:30-37.
19. Dondossola E, Gasparri A, Bachi A, et al. Role of vasostatin-1 C-terminal region in fibroblast cell adhesion. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67:2107-2118.
20. Sugawara M, Resende JM, Moraes CM, et al. Membrane structure and interactions of human catestatin by multidimensional solution and solid-state NMR spectroscopy. *FASEB J*. 2010;24:1737-1746.
21. Kassas N, Tanguy E, Thahouly T, et al. Comparative characterization of phosphatidic acid sensors and their localization during frustrated phagocytosis. *J Biol Chem*. 2017;292:4266-4279.
22. Ammar M-R, Humeau Y, Hanauer A, Nieswandt B, Bader M-F, Vitale N. The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 regulates neurite outgrowth through phosphorylation of phospholipase D1 (PLD1) and synthesis of phosphatidic acid. *J Neurosci*. 2013;33:19470-19479.
23. Ammar MR, Thahouly T, Hanauer A, Stegner D, Nieswandt B, Vitale N. PLD1 participates in BDNF-induced signalling in cortical neurons. *Sci Rep*. 2015;5:14778.
24. Chevalier A, Massif C, Renard P-Y, Romieu A. Bioconjugatable azo-based dark-quencher dyes: synthesis and application to protease-activatable far-red fluorescent probes. *Chemistry*. 2013;19:1686-1699.
25. Montero-Hadjadje M, Vaudry H, Turquier V, et al. Localization and characterization of evolutionarily conserved chromogranin A-derived peptides in the rat and human pituitary and adrenal glands. *Cell Tissue Res*. 2002;310:223-236.
26. Anouar Y, Desmoucelles C, Yon L, et al. Identification of a novel secretogranin ii-derived peptide (SgII 187–252) in adult and fetal human adrenal glands using antibodies raised against the human recombinant peptide. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:2944-2951.
27. Graham JM. Isolation of Golgi membranes from tissues and cells by differential and density gradient centrifugation. *Curr Protoc Cell Biol*. 2001;10:3.9.1-3.9.24.
28. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959;37:911-917.
29. Shui G, Guan XL, Low CP, et al. Toward one step analysis of cellular lipidomes using liquid chromatography coupled with mass spectrometry: application to *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* lipidomics. *Mol Biosyst*. 2010;6:1008.
30. Bénard M, Schapman D, Lebon A, et al. Structural and functional analysis of tunneling nanotubes (TnTs) using gCW STED and gconfocal approaches. *Biol Cell*. 2015;107:419-425.
31. Galas L, Gallavardin T, Bénard M, et al. "Probe, sample, and instrument (PSI)": the hat-trick for fluorescence live cell imaging. *Chemosensors*. 2018;6:40.
32. Huston E, Gall I, Houslay TM, Houslay MD. Helix-1 of the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4A1 regulates its phospholipase-D-dependent redistribution in response to release of Ca2+. *J Cell Sci*. 2006;119:3799-3810.
33. Gautier R, Douguet D, Antonny B, Drin G. HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific alpha-helical properties. *Bioinformatics*. 2008;24:2101-2102.
34. Tanguy E, Kassas N, Vitale N. Protein-phospholipid interaction motifs: a focus on phosphatidic acid. *Biomolecules*. 2018;8:20.
35. Pierce MM, Raman CS, Nall BT. Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods*. 1999;19:213-221.
36. Miao R, Lung S-C, Li X, Li XD, Chye M-L. Thermodynamic insights into an interaction between acyl-coa–binding protein2 and lysophospholipase2 in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*. 2019;294:6214-6226.
37. Freyberg Z, Siddhanta A, Shields D. "Slip, sliding away": phospholipase D and the Golgi apparatus. *Trends Cell Biol*. 2003;13:540-546.
38. Freyberg Z, Sweeney D, Siddhanta A, Bourgoin S, Frohman M, Shields D. Intracellular localization of phospholipase D1 in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. 2001;12:943-955.
39. Gondré-Lewis MC, Park JJ, Loh YP. Cellular mechanisms for the biogenesis and transport of synaptic and dense-core vesicles. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2012;299:27-115.
40. Siddhanta A, Shields D. Secretory vesicle budding from the trans-Golgi network is mediated by phosphatidic acid levels. *J Biol Chem*. 1998;273:17995-17998.
41. Cullis PR, Hope MJ, Bally MB, Madden TD, Mayer LD, Fenske DB. Influence of pH gradients on the transbilayer transport of drugs, lipids, peptides and metal ions into large unilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1331:187-211.
42. Pomorski TG, Menon AK. Lipid somersaults: uncovering the mechanisms of protein-mediated lipid flipping. *Prog Lipid Res*. 2016;64:69-84.

43. Braks JAM, Martens GJM. 7B2 is a neuroendocrine chaperone that transiently interacts with prohormone convertase PC2 in the secretory pathway. *Cell*. 1994;78:263-273.
44. Aunis D, Metz-Boutigue MH. Chromogranines: De la découverte à la fonction. *Medecine/Sciences*. 2001;17:418-427.
45. Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT. The chromogranin-secretogranin family. *N Engl J Med*. 2003;348:1134-1149.
46. Potocký M, Pleskot R, Pejchar P, Vitale N, Kost B, Žárský V. Live-cell imaging of phosphatidic acid dynamics in pollen tubes visualized by Spo20p-derived biosensor. *New Phytol*. 2014;203:483-494.
47. Kooijman EE, Chupin V, de Kruijff B, Burger KNJ. Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Traffic*. 2003;4:162-174.
48. Sahu BS, Obbineni JM, Sahu G, et al. Functional genetic variants of the catecholamine-release-inhibitory peptide catestatin in an indian population. *J Biol Chem*. 2012;287:43840-43852.
49. Kiranmayi M, Chirasani VR, Allu PKR, et al. Catestatin Gly364Ser variant alters systemic blood pressure and the risk for hypertension in human populations via endothelial nitric oxide pathway. *Hypertension*. 2016;68:334-347.
50. Riebeling C, Morris AJ, Shields D. Phospholipase D in the Golgi apparatus. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1791:876-880.
51. Vitale N, Caumont AS, Chasserot-Golaz S, et al. Phospholipase D1: a key factor for the exocytotic machinery in neuroendocrine cells. *EMBO J*. 2001;20:2424-2434.
52. Pasqua T, Mahata S, Bandyopadhyay GK, et al. Impact of Chromogranin A deficiency on catecholamine storage, catecholamine granule morphology and chromaffin cell energy metabolism in vivo. *Cell Tissue Res*. 2016;363:693-712.
53. Park SY, Yang JS, Li Z, et al. The late stage of COPI vesicle fission requires shorter forms of phosphatidic acid and diacylglycerol. *Nat Commun*. 2019;10:1-14.
54. Rahajeng J, Kuna RS, Makowski SL, et al. Efficient Golgi forward trafficking requires GOLPH3-driven, PI4P-dependent membrane curvature. *Dev Cell*. 2019;50:573-585.
55. Zhukovsky MA, Filograna A, Luini A, Corda D, Valente C. Protein amphipathic helix insertion: a mechanism to induce membrane fission. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:1-29.
56. Cruz-Garcia D, Ortega-Bellido M, Scarpa M, et al. Recruitment of arfaptins to the trans-Golgi network by PI(4)P and their involvement in cargo export. *EMBO J*. 2013;32:1717-1729.
57. Gehart H, Goginashvili A, Beck R, et al. The BAR domain protein arfaptin-1 controls secretory granule biogenesis at the trans-Golgi network. *Dev Cell*. 2012;23:756-768.
58. Delestre-Delacour C, Carmon O, Laguerre F, et al. Myosin 1b and F-actin are involved in the control of secretory granule biogenesis. *Sci Rep*. 2017;7:5172.
59. Hummer BH, de Leeuw NF, Burns C, et al. HID-1 controls formation of large dense core vesicles by influencing cargo sorting and trans-Golgi network acidification. *Mol Biol Cell*. 2017;28:3870-3880.
60. Vitale N, Chasserot-Golaz S, Bailly Y, Morinaga N, Frohman MA, Bader MF. Calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles requires the activation of ADP-ribosylation factor (ARF)6 by ARF nucleotide binding site opener at the plasma membrane. *J Cell Biol*. 2002;159:79-89.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Carmon O, Laguerre F, Riachy L, et al. Chromogranin A preferential interaction with Golgi phosphatidic acid induces membrane deformation and contributes to secretory granule biogenesis. *The FASEB Journal*. 2020;34:6769–6790. https://doi.org/10.1096/fj.202000074R

II. Article 2 (en préparation)

La sécrétion régulée des cellules neuroendocrines entraîne la présence de chromogranine A au niveau des sites exocytiques

Article en préparation

Dans l'article précédent, nous avons démontré l'implication de l'interaction entre la CgA et le PA de la membrane golgienne dans la déformation de la membrane du TGN et le bourgeonnement des GSCD au sein des cellules neuroendocrines. Ces acteurs moléculaires ayant séparément un rôle démontré dans la fusion des GSCD et l'exocytose régulée (Abbineni et al., 2019; Tanguy et al., 2020; Yoo et al., 2005), nous nous sommes demandés si ces évènements pouvaient être régis par l'interaction de la CgA avec le PA.

Dans l'article en préparation présenté ici, nous avons d'ores et déjà montré, à l'aide de la microscopie confocale, que la fusion des GSCD consécutive à la stimulation des cellules chromaffines bovines entraîne la présence d'une fraction des molécules de CgA au niveau de la membrane granulaire insérée à la membrane plasmique. L'analyse à l'aide de la microscopie électronique à transmission de la face interne de la membrane plasmique de ces cellules révèle la présence des molécules de CgA au niveau des sites exocytiques. Par ailleurs, nous avons montré que la désorganisation de la structure secondaire de la CgA, suite à la chélation du calcium du milieu extracellulaire de cellules chromaffines préalablement stimulées entraîne un relarguage des molécules de CgA, ce qui démontre que des molécules de CgA sont associées à la membrane plasmique suite à la fusion des GSCD. L'interaction de la CgA avec le PA ayant été démontrée, nous avons étudié l'impact de l'inhibition de la synthèse du PA généré par la voie des PLD au sein des cellules chromaffines, et nous avons constaté une diminution de la sécrétion régulée des molécules de CgA et de CAs.

Objectifs :

- ⇒ Des molécules de CgA sont-elles associées à la membrane plasmique suite à la fusion des GSCD ?
- ⇒ Ces molécules sont-elles localisées au niveau des sites de fusion ?
- ⇒ L'inhibition de la synthèse du PA impacte-t-elle la sécrétion de la CgA et des CAs ?

Regulated secretion in neuroendocrine cells induces the occurrence of chromogranin A at the level of exocytic sites

Fanny Laguerre[1], Lydie Jeandel[1], Sylvette Chasserot-Golaz[2], Nicolas Vitale[2], Youssef Anouar[1] and Maité Montero-Hadjadje[1*]

[1] Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM, U1239, Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale de Normandie, 76000, Rouen, France

[2] Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, F-67000 Strasbourg, France

[*] Corresponding author; Tel: +33 235146643; e-mail: maite.montero@univ-rouen.fr

ABBREVIATIONS

BA: Benzylamine
CAs: Catecholamines
CgA: Chromogranin A
DBH: Dopamine-β-hydroxylase
FIPI: 5-Fluoro-2-indolyl des-chlorohalopemide
PA: Phosphatidic Acid
RSP: Regulated secretory pathway
SG: Secretory granule
SNARE: SNAP receptor
TGN: Trans-Golgi network
VMAT2: Vesicular monoamine transporter 2

INTRODUCTION

The regulated secretory pathway (RSP) is a key process governing the release of molecules with a crucial role at the physiological level, such as hormones and neurotransmitters in neuroendocrine cells. The successful completion of the RSP depends on dense core secretory granules (SG), vesicular organelles generated by budding from the *trans*-Golgi network (TGN) membrane. More than several thousand SG can accumulate in neuroendocrine cells for active hormone and neurotransmitter release upon cell stimulation. In chromaffin cells, SG mainly accumulate catecholamines (CAs), granins (chromogranin A or CgA), ATP and ions (Ca^{2+}, Mg^{2+}, H^{+}). Among these soluble components, CgA exhibits the peculiar property to stabilize the SG core by interacting with all granular ions and molecules (Aunis and Metz-Boutigue, 2001), and more particularly due to its Ca^{2+} affinity which governs its secondary conformation (Yoo, 1996). Furthermore, CgA has been shown to exert a crucial role in SG biogenesis (Kim et al., 2001; Mahapatra et al., 2005). Several studies were conducted to identify the CgA molecular mechanism of action, and demonstrated the involvement of helicoidal motives located in the terminal domains of the protein (Montero-Hadjadje et al., 2009; Taupenot et al., 2002). The Ca^{2+}-induced helicoidal conformation of CgA suggests its propensity to bind biological membranes. In a recent study, we showed that CgA interacts with PLD-generated phosphatidic acid (PA), a conical phospholipid with a key role in the RSP regulation (Tanguy et al., 2016), and that this interaction induces curvature and remodeling of the TGN membrane leading to SG budding (Carmon et al., 2020). This molecular partner of CgA may represent the missing link at the level of the TGN membrane between CgA and cytosolic actors also strongly involved in the budding of SG, such as the acto-myosin 1b complex (Delestre-Delacour et al., 2017). Resulting SG are routed to the plasma membrane where they are sequestered in the cortical actin network. At this level, cytosolic Ca^{2+} influx induced by cell stimulation triggers the recruitment, docking and fusion of SG with the plasma membrane, leading to hormone and neurotransmitter release. This regulated exocytosis can take place in different modes depending on physiological needs (Fulop et al., 2005; Fulop and Smith, 2006). Indeed, the “kiss and run” exocytosis is characterized by the release of small molecules, such as CAs, through the fusion pore, while larger neuropeptides are retained in the SG. The “kiss and stay” exocytosis results in the preservation of the Ω form of the fusing granule and to the partial release of neuropeptides, while during the “full fusion” mode, SG lose their round shape by merging with the plasma membrane to completely release their content (Liang et al., 2017). Interestingly, CgA has also been described to endow a role in these key stages of exocytosis. Indeed, Yoo's

team has shown that CgA interacts with the SNARE proteins syntaxin 1A and synaptotagmin I, which are key participants of the fusion complex during exocytotic processes. This interaction suggests an active participation of CgA in the formation of the fusion complex and subsequent exocytosis (Yoo et al., 2005). More recently, Holz's team demonstrated that CgA controls fusion pore expansion during the regulated exocytosis in chromaffin cells (Abbineni et al., 2018). Furthermore, it has been previously shown that CgA interaction with CAs in the SG lumen governs exocytosis (Dominguez et al., 2014; Machado et al., 2010). Thus, interestingly, CgA could be considered as a link between soluble molecules, which are released in a controlled manner, and the proteins regulating the fusion complex during exocytosis. Recently, we demonstrated that CgA specifically interacts with certain monounsaturated and polyunsaturated PA species (Carmon et al., 2020), the same which have been recently described to control various stages of the regulated exocytosis of neuroendocrine cells, such as SG docking, fusion pore stability and expansion (Tanguy et al., 2020). Altogether, these data suggest that CgA, by interacting by turns with all these membrane and soluble granular components, is a central actor of the regulated exocytosis.

In the present study, we analyzed the behavior of CgA during SG exocytosis, and observed the unexpected presence of plasma membrane-bound CgA after cell stimulation. At this level, we demonstrated that CgA colocalized with granular membrane proteins at exocytic sites, and that extracellular Ca^{2+} chelation provoked the release of CgA from the plasma membrane of stimulated chromaffin cells. Furthermore, the pharmacological inhibition of PLD provokes a decrease of the regulated secretion of CAs and CgA. Altogether, these results suggest the implication of the interaction between CgA and PLD-derived PA in the regulated secretory pathway in neuroendocrine cells.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Primary culture of bovine chromaffin cells

Chromaffin cells are obtained from bovine adrenal glands aged 6 to 24 months, collected from a local slaughterhouse (according to authorization n°1069/2009 DDPP76/SPAE). After removing the surrounding fat and connective tissue from these glands, they are rinsed with 75% ethanol and then placed in cold Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, Thermo Fisher Scientific) with a mixture of antibiotics and anti-fungal (Anti-Anti, Gibco, Thermo

Fisher Scientific). The adrenal vein is first perfused with approximately 30 mL of Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco, Thermo Fisher Scientific) to remove blood from the vasculature. Then, each gland is digested with an enzymatic solution containing *Clostridium histolyticum* Collagenase P (Roche), Dnase (Gibco, Thermo Fisher Scientific) and trypsin (Sigma-Aldrich) (0.75 mg/0.62 mg/22.5U per ml respectively), for 30 minutes at 37°C, with stirring, before being dissected in order to separate the cortical and medullary parts. There follows a mechanical dissociation of the adrenal medulla *via* aspirations / repressions and a new incubation of the fragments of the adrenal medulla with the enzymatic solution is carried out for 10 minutes at 37°C with stirring. A further dissociation is carried out by filtration through a sieve with a mesh of 1 mm in diameter, followed by the elimination of the enzymatic solution by centrifugation for 8 minutes at 500 g. The cell pellet obtained is taken up in DMEM containing 1 % Anti-Anti and filtered through a sieve of 217 µm in diameter mesh and then through a 100 µm filter (Cell Strainers, Dutscher) in order to remove cell aggregates. Removal of the remaining red blood cells is permitted by their hypotonic bursting with cold water for 10 seconds, followed by the immediate addition of 30 mL of DMEM supplemented with 1% Anti-Anti at 37°C, before another centrifugation of the cell suspension for 5 minutes at 500 g. After removing the supernatant, chromaffin cells are taken up in complete DMEM medium containing 5% Fetal Bovine Serum (FBS, Sigma-Aldrich), 2.5% sterile-filtered HyClone Donor Equine serum (GE Healthcare, Life Sciences), 4 mM L-glutamine 100X (Gibco, Thermo Fisher Scientific) and 100 µg/mL primocin (InvivoGen), distributed in T75 flasks and incubated for at least 1 hour (37°C, 5% CO2). This seeding for 1 hour allows chromaffin cell the isolation the from the other cell types of the medullary tissue such as fibroblasts, endothelial cells and cortical cells. Indeed, it has been shown that “non-chromaffin” cells adhere much more quickly than chromaffin cells to plastic substrates (Ait-Ali et al., 2008; Anouar et al., 1994; Waymire et al., 1983). Then, the chromaffin cells-containing fraction is recovered and centrifuged, the pellet is taken up in 10 mL of complete DMEM and the cells are counted using a Neubauer cell. Chromaffin cells are then distributed at a rate of 100 000 cells per well in 24-well plates containing glass coverslips previously coated with a mixture of poly-L-Lysine (20 µg/mL, 1h) and collagen I (200 µg/mL, overnight) for immunofluorescence studies. For CgA externalization studies, 10 000 000 cells were distributed in T75 flasks previously coated with poly-L-lysine (20 µg/mL, 1h), and for the analyses of CA and CgA secretion, 350 000 and 2 500 000 cells were respectively cultured per well, in 12-well plates and in 6-well plates previously coated with poly-L-lysine (20 µg/mL, 1h). Cultures were maintained for 24 hours at 37°C, 5% CO2 and then the medium was renewed with complete DMEM supplemented with a

mixture of antimitotics (10 µM of cytosine arabinoside and 10 µM of 5-fluoro-cytarabine, Sigma-Aldrich). The experiments tooke place between 3 and 6 days after chromaffin cell seeding.

Western blotting

Chromaffin cells were washed thrice for 10 min with Locke's solution (140 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4, 1.2 mM $MgSO_4$, 11 mM glucose, 0.56 mM ascorbic acid, 0.01 mM Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA), 2.5 mM $CaCl_2$ and 15 mM HEPES, pH 7.4), then 10 min with Locke's solution without Ca^{2+} (140 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4, 1.2 mM $MgSO_4$, 11 mM glucose, 0.56 mM ascorbic acid, 1 mM ethylene glycol-tetraacetic acid (EGTA) and 15 mM HEPES, pH 7.4), to discard cellular debris. Cells were then stimulated for 10 min with 4 mL of 40 µM ACh in Locke's solution. Similarly, control cells were treated with Locke's solution. The media of stimulated cells were recovered (fraction "secreted material") and the cells were further treated for 10 min with Ca^{2+}-free Locke's solution containing 1mM EGTA (fraction "EGTA eluate"). Secreted material and the EGTA eluate fractions were precipitated using 10% trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich). Then, secreted materials, EGTA eluates and cell contents were separated by SDS-PAGE followed by Western blotting. Membranes were incubated in a blocking buffer containing 5% of nonfat dry milk in PBS containing 0.5% of Tween 20 (Sigma-Aldrich) (PBS-T) for 1 hour at RT, and overnight with primary anti-CgA at 4°C. Then, membranes were washed for 45 minutes with PBS-T. Blots were subsequently incubated for 1 hour with appropriate HRP (Horse Radish Peroxidase)-conjugated secondary antibody (Thermo Fisher Scientific) in blocking buffer. Membranes were washed for 45 minutes with PBS-T and immunoreactive proteins were detected by chemiluminescence (Bio-Rad Biotechnology). Quantification was performed using Image Lab software (5.0 build 18, 2013 version, Bio-Rad Laboratories). The mean intensity of each individual band of interest was calculated after background value subtraction.

Immunofluorescence studies

Chromaffin cells are rinsed twice with Locke's solution (140 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM $CaCl_2$, 1.2 mM KH_2PO_4, 1.2 mM $MgSO_4$, 11 mM glucose and 15 mM HEPES, pH 7.4) then incubated for 5 minutes at 37°C in Locke's solution (control condition) or with Locke's solution containing 40 µM ACh (stimulated condition). After rinsing with Locke's solution, living cells are incubated for 45 min at 4°C with the antibody directed against CgA in Locke's solution containing 0.2% BSA fatty acid free (Sigma-Aldrich). Following the incubation, cells are rinsed

twice with Locke's solution and then fixed with 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma-Aldrich) in PBS for 15 minutes at 4°C before being rinsed twice for 5 minutes with PBS. Then, cells were permeabilized and blocked for 30 minutes with 0.3% Triton X-100 (Thermo Fisher Scientific), in PBS containing 5% of normal donkey serum (Sigma-Aldrich) (1:50) and 1% of BSA. Cells were then incubated for 2 hours at RT with anti-VMAT2 antibodies, and for 1 hour with secondary antibodies. Nuclei were stained with DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindole, Molecular probes) (1 µg mL−1). To verify the specificity of the immunoreactions, the primary or secondary antibodies were substituted with PBS.

Plasma membrane sheet preparation and transmission electron microscopy observation

To label dopamine ß-hydroxylase (DBH) and CgA present at the surface of cells undergoing exocytosis, cells were stimulated 5 min with 20 µM nicotine and fixed with 2% PFA in PBS during 10 min at 4°C. After washing with PBS and blocking in PBS with 1% BSA and 1% acetylated BSA 3h at 37°C, the cells were incubated with antibodies anti-CgA and anti-DBH overnight at 4°C. Then the samples were washed 6 times with PBS and incubated 3 h with 10 nm gold particle-conjugated goat anti-rabbit IgG and 15 nm gold particle-conjugated goat anti-mouse IgG (Aurion). After 6 washes with PBS, plasma membrane sheets were prepared and processed as previously described (Gabel et al., 2020). Briefly, carbon coated Formvar films on nickel electron grids were inverted onto labelled cells, pressure was applied to the grids with a cork for 20 s, then the grids were lifted so that the fragments of the upper cell surface adhered to the grid. These membrane fragments were fixed in 2.5% glutaraldehyde in PBS, post-fixed with 0.5% OsO4, dehydrated in a graded ethanol series, treated with hexamethyldisilazane (Sigma-Aldrich), air-dried and observed using a Hitachi 7500 transmission electron microscope.

Determination of catecholamines (CAs) secretion

Secretion experiments

The cell culture medium was replaced by Krebs/HEPES (K/H) basal solution containing 125 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4, 1.2 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 2 mM $CaCl_2$, 2.8 mM glucose, 26 mM $NaHCO_3$, and 0.1% BSA (Roche) (pH 7.4). After a one-hour pre-incubation with or without the addition of FIPI 100 nM (Sigma-Aldrich), a first 15-minute incubation period (P1) is followed by a second incubation period (P2) in which cells can stimulated by ACh chloride (Sigma-Aldrich) 20 µM in K/H or in FIPI solution. CAs were kept

frozen (-20°C) before detection in P1 and P2 incubation media by fluorescence after derivatization procedure.

Derivatization of CAs with benzylamine (BA)

These experiments were adapted from the original protocol described by Guérineau's team (De Nardi et al., 2017). The derivatization reactions were carried out by mixing 100 µl of an epinephrine calibration curve solution in HBSS (0.05 to 100 µM) or test incubation media with 200 µl of the benzylamine derivatization reagent solution (20 µl benzylamine hydrochloride 0.4M (Sigma-Aldrich) in 90% aqueous methanol; 10 µl 3-cyclohexylaminopropanesulfonic acid (Sigma-Aldrich) buffer 0.1M, lead to pH 11/KOH and 10 µl potassium hexacyanoferrate III 10 mM (Sigma-Aldrich) in 50% aqueous methanol). The vial was heated at 50°C for 30 min in a thermomixer compact (Eppendorf). After cooling in ice, 200 µl aliquot of reaction mixture was placed onto 96-well plates (Costar). The fluorescent spectra of the solutions were recorded by FlexStation3 spectrophotometer (Molecular Devices, LLC) in the wavelength range of λ 480 nm (ex λ 356 nm).

Expression of results

The principle of this protocol is based on a bio-detection system of the production of highly fluorescent CAs derivatives (CAs and amino-aromatic precursors and metabolites) with benzylamine, for a rapid determination without products separation and with minimal treatment. Since the derivatives of aromatic amines have similar spectroscopic characteristics, their initial fluorescence spectra strongly overlap. This almost complete overlap makes difficult to distinguish between the different CAs in a mixture. However, the basal or stimulated secretion analytes in the incubation media are in similar relationships depending on our pre-treatment. Therefore, we consider possible that the dosed combination reflects the amounts of adrenaline and noradrenaline (and very low dopamine) released by healthy chromaffin cells. Other types of calibration curves could have been tested such as an epinephrin/noradrenaline/dopamine mixture, but we chose to calibrate with adrenaline and thus express the results of the mixed analytes released in µM of adrenaline. Graphs were plotted and data were analysed using GraphPad Prism 6.04 software. Group differences were compared using the nonparametric Mann–Whitney.

Determination of CgA secretion

Chromaffin cells were rinsed twice with Locke's solution and incubated in Locke's (control condition) or Locke's containing 100 nM FIPI (FIPI condition) solutions for 1 hour at 37°C. Then, cells were incubated for 5 minutes at 37°C in Locke's solution (basal release of CgA) or with Locke's solution containing 40 µM ACh (stimulated release of CgA). Secretion media were collected, cleared by centrifugation (5 min, 1800 g, 4°C) and proteins contained in secretion media were precipitated using 10% trichloroacetic acid and stored in Laemmli buffer. Secretion media were analyzed by Western blotting.

Antibodies and reagents

Primary antibodies used were rabbit monoclonal anti-CgA (MA5-14536; Thermo Fisher Scientific) (1:150 for living cells and 1:250 for fixed cells), rabbit polyclonal anti-CgA (WE-14) (Montero-Hadjadje et al., 2002) (1:500), mouse monoclonal anti-VMAT2 (sc-374079, Santa Cruz Biotechnology) (1:100) mouse monoclonal anti-α-tubulin (T5168, Sigma-Aldrich) (1:5000). For IF, secondary antibodies used were Alexa 488-conjugated donkey anti-rabbit IgG; Alexa 594-conjugated donkey anti-mouse IgG (Invitrogen) (1:500). For electron microscopy, primary antibodies used were mouse monoclonal anti-DBH (clone 4F10.2, EC.1.14.17.1: DBH, Merck Millipore) (1:50) and rabbit polyclonal anti-CgA (WE-14) (1:100). For Western blotting, anti-rabbit and anti-mouse secondary antibodies conjugated to horseradish peroxydase (Thermo Fisher Scientific) (1:5000) were used.

RESULTS

Regulated exocytosis of chromaffin cells results in the presence of CgA at VMAT2-enriched microdomains of the plasma membrane

The stimulation of SG exocytosis induces the release of soluble molecules and the insertion of membrane molecules to the plasma membrane. Then, proteins associated with the intraluminal membrane of SG display a transient contact with the extracellular space after the expansion of the fusion pore. Based on the protocol used by Ceridono et al. (2011) to visualize dopamine-β-hydroxylase (DBH) associated to SG membrane after regulated exocytosis, we stimulated cultured bovine chromaffin cells during 10 min with 40 µM acetycholine (ACh) and incubated living cells with anti-CgA antibodies placed in the extracellular medium. Using confocal microscopy, we observed a significant increase of the number of CgA-labelled spots, compared to unstimulated chromaffin cells (**Figure 1A**). This observation suggests that some

intragranular CgA molecules remain associated to the cell surface after SG fusion. In order to characterize the position of CgA-labelled spots after cell stimulation, we performed a colocalization study using antibodies raised against vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2), a granular transmembrane protein, and we observed that CgA-labelled spots colocalize with some VMAT2-labelled structures that could be consistent with exocytic sites (**Figure 1B**). These data indicated that cell surface-bound CgA results from SG membrane fusion with the plasma membrane during regulated exocytosis.

Regulated exocytosis induces CgA association with exocytic sites

To further explore the spatial relationship between CgA and exocytic sites, we analyzed the ultrastructure of the plasma membrane inner face and the distribution of CgA using immunogold coupled to transmission electron microscopy on membrane sheets (Gabel et al., 2020; Tanguy et al., 2020). The localization of CgA after exocytosis was examined on the plasma membrane of 20 µM nicotine-stimulated chromaffin cells in the presence of antibodies raised against CgA and DBH to reveal exocytic granular membranes (Bittner et al., 2013; Ceridono et al., 2011). Cells were then fixed and labeled with secondary antibodies coupled to 10nm gold particles and 15nm gold particles to reveal CgA and DBH, respectively. We observed that DBH clusters on the cell surface, corresponding to the insertion of the granular membrane into the plasma membrane after cell stimulation, also contain CgA (**Figure 2**). The two proteins were found close enough to suggest the interaction of CgA with the exocytic sites after SG fusion, as it was demonstrated for DBH. Since CgA association with biological membranes could result from its helicoidal structure which depends on its intrinsic affinity for Ca^{2+} (Aunis and Metz-Boutigue, 2001; Yoo, 1996), we decided to further analyze CgA interaction with the outer membrane surface of chromaffin cells after SG fusion, using a Ca^{2+}-chelating agent. After cell stimulation with ACh, and an expected significant CgA secretion, we replaced the secretion medium by an EGTA-containing medium. After incubation at 37°C, an increase of CgA concentration was detected in EGTA eluates (**Figure 3**), confirming that CgA molecules interacted with the plasma membrane, and that they were more particularly associated to exocytic sites.

PLD-generated PA controls the regulated secretion of CAs and CgA

Since PLD appears to be the major enzyme involved in PA synthesis at the plasma membrane level (Tanguy et al., 2020), we inhibited the synthesis of PLD-mediated PA to study its involvement in the regulated secretion of CAs and CgA. Chromaffin cells were then incubated

with the PLD pan-inhibitor FIPI, in basal or stimulated conditions. In basal condition, we observed a very slight and non-significant increase of CA secretion from 10.8 ± 3 µM in untreated cells to 11.6 ± 4 µM after cell incubation with FIPI. So, the ratio P2/P1 was 0.73 for control and 0.83 for FIPI conditions (**Figure 4A**). In stimulated conditions, we observed that FIPI significantly reduces the release of CAs, with a corresponding P2/P1 ratio of 1.94 versus 3.07 in untreated cells (**Figure 4A**). Preliminary experiments indicated a same effect on the regulated CgA secretion, the FIPI treatment inducing a decrease of CgA release in stimulated conditions (**Figure 4B**). Thus, these results indicate that PLD-derived PA is involved in the regulated secretion of CAs and CgA in chromaffin cells.

These first data demonstrate that CgA interacts at exocytic sites after SG fusion and suggest that PLD-derived PA could be implicated in this interaction, as we recently showed CgA/Golgi PA interaction (Carmon et al., 2020). Further experiments are now needed to demonstrate that CgA interacts with plasma membrane PA to govern the regulated secretion in chromaffin cells. Is CgA involved in plasma membrane PA recruitment to control SG fusion pore expansion? Is this interaction crucial for compensatory endocytosis and cell homeostasis?

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by institutional funding from INSERM, University of Rouen-Normandie, IRIB, Région Normandie, the European Regional Development Funds (ERDF DO-IT2015 program), grants from Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) (DEI20151234424) and from the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-19-CE44-0019) to N.V. and MM-H. FL is co-supported by European Union and Région Normandie.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

F. Laguerre and L. Jeandel designed and performed most of the experiments, analyzed the data, managed cell line culture and contributed to writing of the paper; S. Chasserot-Golaz performed plasma membrane sheets and transmission electron microscopy observation; N. Vitale and Y.

Anouar contributed to data analysis and interpretation, and writing of the paper; M. Montero-Hadjadje coordinated the study, designed and interpreted data, and wrote the paper.

REFERENCES

Abbineni, P.S., Bittner, M.A., Axelrod, D., Holz, R.W., 2018. Chromogranin A, the major lumenal protein in chromaffin granules, controls fusion pore expansion. J. Gen. Physiol. 151, 118–130. https://doi.org/10.1085/jgp.201812182

Ait-Ali, D., Turquier, V., Tanguy, Y., Thouënnon, E., Ghzili, H., Mounien, L., Derambure, C., Jégou, S., Salier, J.P., Vaudry, H., Eiden, L.E., Anouar, Y., 2008. Tumor necrosis factor (TNF)-α persistently activates nuclear factor-κB signaling through the type 2 TNF receptor in chromaffin cells: Implications for long-term regulation of neuropeptide gene expression in inflammation. Endocrinology 149, 2840–2852. https://doi.org/10.1210/en.2007-1192

Anouar, Y., MacArthur, L., Cohen, J., Iacangelo, A.L., Eiden, L.E., 1994. Identification of a TPA-responsive element mediating preferential transactivation of the galanin gene promoter in chromaffin cells. J. Biol. Chem. 269, 6823–6831.

Aunis, D., Metz-Boutigue, M.H., 2001. Chromogranines: De la découverte à la fonction. Medecine/Sciences 17, 418–427. https://doi.org/10.4267/10608/1941

Bittner, M.A., Aikman, R.L., Holz, R.W., 2013. A nibbling mechanism for clathrin-mediated retrieval of secretory granule membrane after exocytosis. J. Biol. Chem. 288, 9177–9188. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.450361

Carmon, O., Laguerre, F., Riachy, L., Delestre-Delacour, C., Wang, Q., Tanguy, E., Jeandel, L., Cartier, D., Thahouly, T., Haeberlé, A.M., Fouillen, L., Rezazgui, O., Schapman, D., Haefelé, A., Goumon, Y., Galas, L., Renard, P.Y., Alexandre, S., Vitale, N., Anouar, Y., Montero-Hadjadje, M., 2020. Chromogranin A preferential interaction with Golgi phosphatidic acid induces membrane deformation and contributes to secretory granule biogenesis. FASEB J. 34, 6769–6790. https://doi.org/10.1096/fj.202000074R

Ceridono, M., Ory, S., Momboisse, F., Chasserot-Golaz, S., Houy, S., Calco, V., Haeberlé, A.M., Demais, V., Bailly, Y., Bader, M.F., Gasman, S., 2011. Selective recapture of secretory granule components after full collapse exocytosis in neuroendocrine chromaffin cells. Traffic 12, 72–88. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01125.x

De Nardi, F., Lefort, C., Bréard, D., Richomme, P., Legros, C., Guérineau, N.C., 2017. Monitoring the secretory behavior of the rat adrenal medulla by high-performance liquid

chromatography-based catecholamine assay from slice supernatants. Front. Endocrinol. (Lausanne). 8. https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00248

Delestre-Delacour, C., Carmon, O., Laguerre, F., Estay-Ahumada, C., Courel, M., Elias, S., Jeandel, L., Rayo, M.V., Peinado, J.R., Sengmanivong, L., Gasman, S., Coudrier, E., Anouar, Y., Montero-Hadjadje, M., 2017. Myosin 1b and F-actin are involved in the control of secretory granule biogenesis. Sci. Rep. 7. https://doi.org/10.1038/s41598-017-05617-1

Dominguez, N., Estevez-Herrera, J., Borges, R., Machado, J.D., 2014. The interaction between chromogranin A and catecholamines governs exocytosis. FASEB J. 28, 4657–4667. https://doi.org/10.1096/fj.14-249607

Fulop, T., Radabaugh, S., Smith, C., 2005. Activity-dependent differential transmitter release in mouse adrenal chromaffin cells. J. Neurosci. 25, 7324–7332. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2042-05.2005

Fulop, T., Smith, C., 2006. Physiological stimulation regulates the exocytic mode through calcium activation of protein kinase C in mouse chromaffin cells. Biochem. J. 399, 111–119. https://doi.org/10.1042/BJ20060654

Gabel, M., Royer, C., Thahouly, T., Bader, M., Vitale, N., Chasserot-golaz, S., 2020. Annexin A2 Egress during Calcium-Regulated Exocytosis in Neuroendocrine Cells. Cells 1–14.

Kim, T., Tao-Cheng, J.H., Eiden, L.E., Loh, Y.P., 2001. Chromogranin A, an “on/off” switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. Cell 106, 499–509.

Liang, K., Wei, L., Chen, L., 2017. Exocytosis, endocytosis, and their coupling in excitable cells. Front. Mol. Neurosci. 10, 1–10. https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00109

Machado, J.D., Díaz-Vera, J., Domínguez, N., Alvarez, C.M., Pardo, M.R., Borges, R., 2010. Chromogranins A and B as regulators of vesicle cargo and exocytosis. Cell. Mol. Neurobiol. 30, 1181–7. https://doi.org/10.1007/s10571-010-9584-y

Mahapatra, N.R., O’Connor, D.T., Vaingankar, S.M., Hikim, A.P.S., Mahata, M., Ray, S., Staite, E., Wu, H., Gu, Y., Dalton, N., Kennedy, B.P., Ziegler, M.G., Ross, J., Mahata, S.K., 2005. Hypertension from targeted ablation of chromogranin A can be rescued by the human ortholog. J. Clin. Invest. 115, 1942–1952. https://doi.org/10.1172/JCI24354

Montero-Hadjadje, M., Elias, S., Chevalier, L., Benard, M., Tanguy, Y., Turquier, V., Galas, L., Yon, L., Malagon, M.M., Driouich, A., Gasman, S., Anouar, Y., 2009. Chromogranin A promotes peptide hormone sorting to mobile granules in constitutively and regulated secreting cells. Role of conserved N- and C-terminal peptides. J. Biol. Chem. 284, 12420–12431. https://doi.org/10.1074/jbc.M805607200

Montero-Hadjadje, M., Vaudry, H., Turquier, V., Leprince, J., Do Rego, J.L., Yon, L., Gallo-Payet, N., Plouin, P.F., Anouar, Y., 2002. Localization and characterization of evolutionarily conserved chromogranin A-derived peptides in the rat and human pituitary and adrenal glands. Cell Tissue Res. 310, 223–236. https://doi.org/10.1007/s00441-002-0625-9

Tanguy, E., Carmon, O., Wang, Q., Jeandel, L., Chasserot-Golaz, S., Montero-Hadjadje, M., Vitale, N., 2016. Lipids implicated in the journey of a secretory granule: from biogenesis to fusion. J. Neurochem. https://doi.org/10.1111/jnc.13577

Tanguy, E., Costé de Bagneaux, P., Kassas, N., Ammar, M.-R., Wang, Q., Haeberlé, A.-M., Raherindratsara, J., Fouillen, L., Renard, P.Y., Montero, M., Chasserot-Golaz, S., Ory, S., Gasman, S., Bader, M.F., Vitale, N., 2020. Mono- and Polyunsaturated Phosphatidic Acid Regulate Distinct Steps of Regulated Exocytosis in Neuroendocrine Cells. Cell Rep. https://doi.org/10.2139/ssrn.3565034

Taupenot, L., Harper, K.L., Mahapatra, N.R., Parmer, R.J., Mahata, S.K., O'Connor, D.T., 2002. Identification of a novel sorting determinant for the regulated pathway in the secretory protein chromogranin A. J. Cell Sci. 115, 4827–4841. https://doi.org/10.1242/jcs.00140

Waymire, J.C., Bennett, W.F., Boehme, R., Hankins, L., Gilmer-Waymire, K., Haycock, J.W., 1983. Bovine adrenal chromaffin cells: high-yield purification and viability in suspension culture. J. Neurosci. Methods 7, 329–351. https://doi.org/10.1016/0165-0270(83)90026-2

Yoo, S.H., 1996. pH- and Ca2+-dependent aggregation property of secretory vesicle matrix proteins and the potential role of chromogranins A and B in secretory vesicle biogenesis. J. Biol. Chem. 271, 1558–1565. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)44964-7

Yoo, S.H., You, S.H., Huh, Y.H., 2005. Presence of syntaxin 1A in secretory granules of chromaffin cells and interaction with chromogranins A and B. FEBS Lett. 579, 222–228. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.11.079

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Stimulation of chromaffin cells results in the presence of CgA at VMAT2-labelled sites of the plasma membrane. A) Living chromaffin cells in resting condition (control) or stimulated with acetylcholine (40 µM ACh) were incubated with monoclonal anti-CgA antibody for 45 min at 4°C. Cells were then fixed and processed for immunofluorescence

with Alexa-488-conjugated anti-rabbit antibody to examine CgA plasma membrane immunoreactivity using confocal microscopy. Representative confocal microscopy sections throughout the cells are shown and were used to quantify automatically the exocytotic sites. Values for the number of positive CgA exocytic sites are plotted as the means ± SEM (n=6, 90 cells per conditions). ****$P < 0.0001$, Mann-Whitney test. The scale bar represents 25 µm. **B)** Living chromaffin cells in resting condition (control) or stimulated with acetylcholine (40 µM ACh) were incubated with monoclonal anti-CgA antibody for 45 min at 4°C. Cells were then fixed and processed for immunofluorescence with monoclonal antibody raised against VMAT2. Anti-CgA was revealed with Alexa-488-conjugated anti-rabbit antibody, and anti-VMAT2 was revealed with Alexa-594-conjugated anti-mouse antibody. Representative confocal microscopy sections throughout the cells are shown. White arrows show CgA and VMAT2 colocated exocytic sites. The scale bar represents 25 µm.

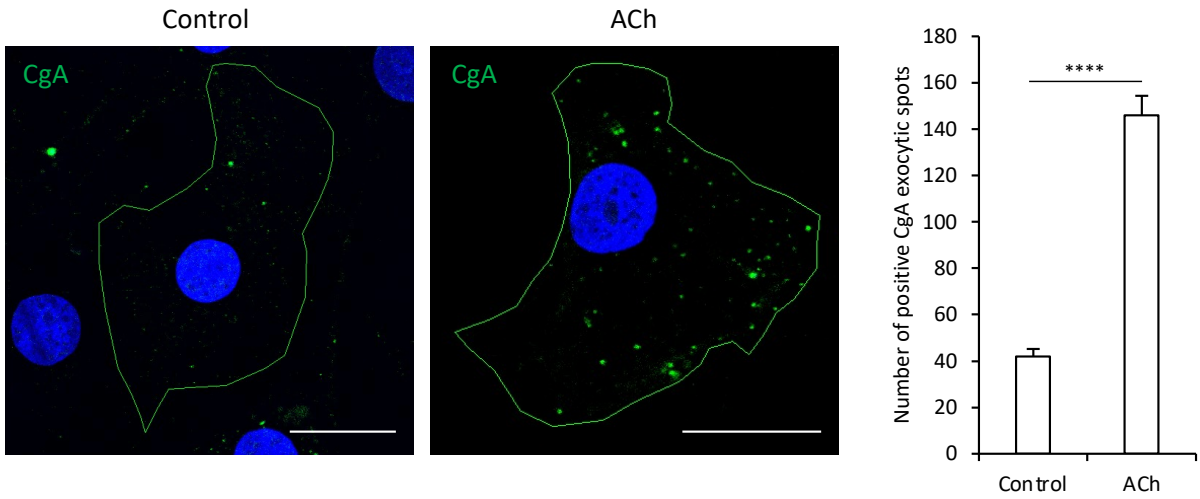
FIGURE 2. CgA is associated to DBH-labelled exocytotic sites at the surface of stimulated chromaffin cells. Electron micrograph of dual staining of CgA (10-nm gold particles, red circles) and DBH (15-nm gold particles, purple circles) on the outer face of the plasma membrane sheets obtained from nicotine-stimulated bovine chromaffin cells. Scale bars: 100 nm.

FIGURE 3. Extracellular calcium chelation results in the release of CgA from the plasma membrane of stimulated chromaffin cells. Secreted material and EGTA eluate from chromaffin cells in resting conditions (R) or stimulated with 40 µM acetylcholine (S) were analyzed by western blot and detected with anti-CgA antibody. Data are given as the mean values ± SEM obtained in three independent experiments (n=3) and a typical western blot experiment is shown.

FIGURE 4. The pharmacological inhibition of PLD alters the regulated secretion of CAs and CgA. A) Two successive incubation periods (P1 and P2) of 15 min were carried out to measure catecholamine secretion from chromaffin cells in basal (control) and stimulated (20 µM ACh) conditions, in the absence or presence of FIPI (100 nM). The results were then represented in a P2/P1 ratio in order to normalize the results taking in account the baseline secretion rates. (N = 6 experiments, n = 3 independent wells per condition) * p <0.025, ** p <0.01, *** p <0.001, Mann-Whitney test. **B)** CgA secretion was measured in the medium of cultured bovine chromaffin cells in the absence (control) or presence of 100 nM PLD inhibitor

(FIPI) for 1 h before stimulation for 10 min with 40 µM ACh. Secretion of CgA was estimated by western blot quantification of CgA in the medium from resting (control) and stimulated (ACh) cells. Data are given as the mean values ± SEM obtained from three independent experiments (n = 3).

A


Control
ACh
CgA
CgA
Number of positive CgA exocytic spots
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
****
Control
ACh

B

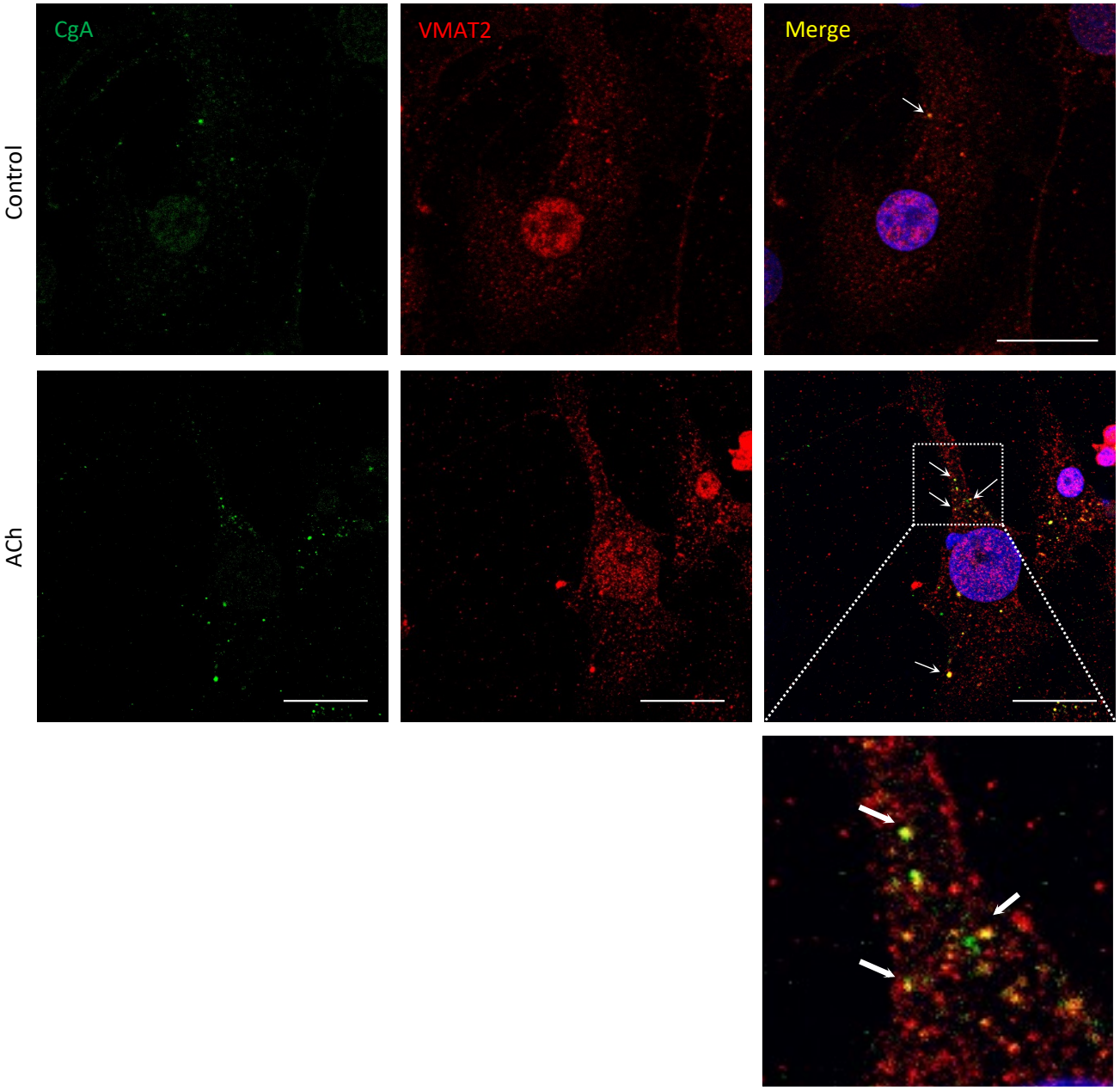

CgA
VMAT2
Merge
Control
ACh

Figure 1

CgA (10 nm) / DBH (15 nm)

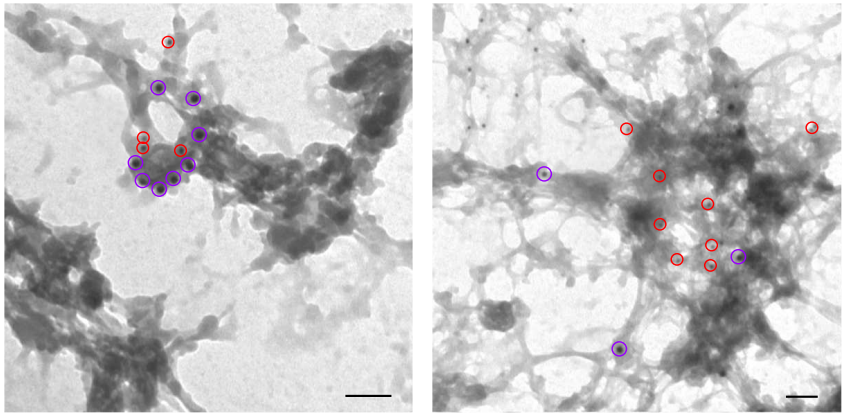


Figure 2

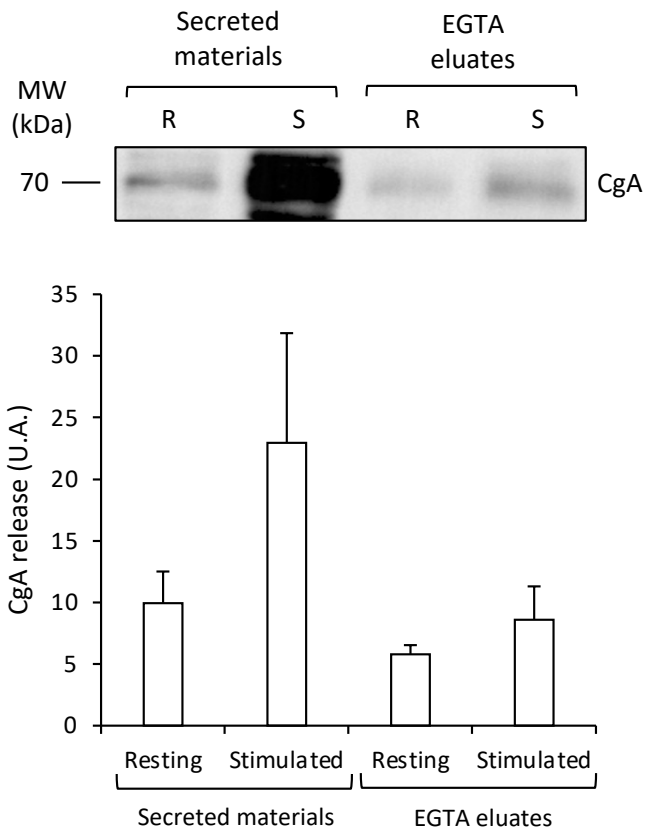
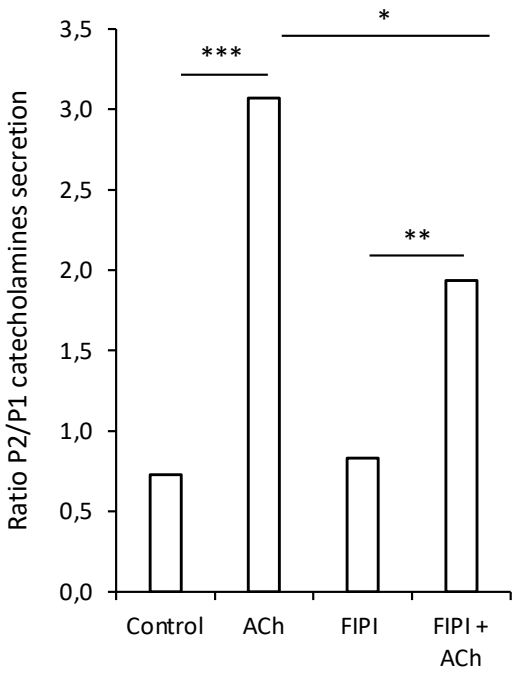

Secreted materials
EGTA eluates
MW (kDa)
R
S
R
S
70
CgA
CgA release (U.A.)
35
30
25
20
15
10
5
0
Resting
Stimulated
Resting
Stimulated
Secreted materials
EGTA eluates

Figure 3

A


Ratio P2/P1 catecholamines secretion
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
***
*
**
Control
ACh
FIPI
FIPI + ACh

B

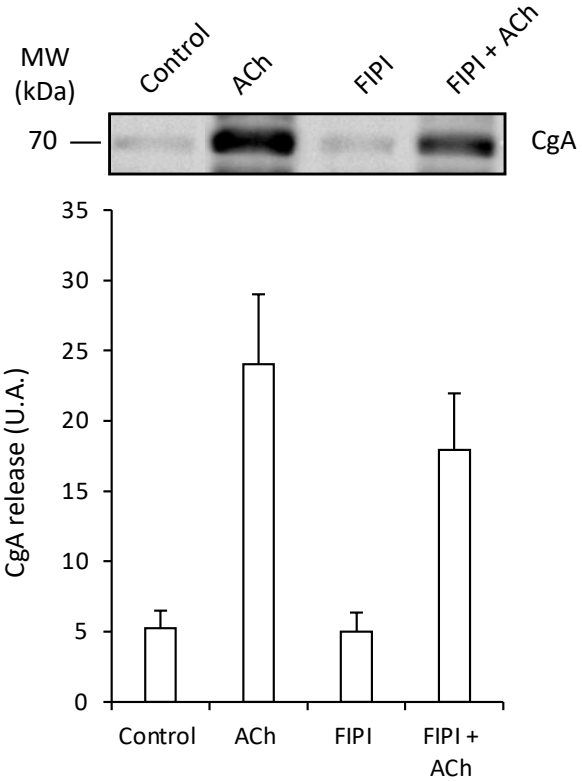

MW (kDa)
Control
ACh
FIPI
FIPI + ACh
70
CgA
CgA release (U.A.)
35
30
25
20
15
10
5
0
Control
ACh
FIPI
FIPI + ACh

Figure 4

DISCUSSION
&
RÉSULTATS
COMPLÉMENTAIRES

Partie III : Discussion & résultats complémentaires

Mes travaux de thèse s'intègrent dans un axe de recherche visant à élucider les mécanismes moléculaires d'action de la CgA, régissant la biogénèse et l'exocytose des GSCD des cellules neuroendocrines. Lors de la sécrétion neuroendocrine, le contenu devant être adressé aux GSCD est trié au sein du TGN puis concentré au niveau de microdomaines de la membrane de ce compartiment *via* diverses protéines clés, telles que les granines, les pro-hormones convertases (dont la CPE) et les V-ATPases. Ensuite, le bourgeonnement des GSCD est dépendant d'une part de lipides clés présents au sein de la membrane du TGN, tels que le cholestérol ou le PA, et d'autre part, de protéines cytosoliques telles que des kinases, des GTPases et des protéines du manteau. Suite au bourgeonnement des GSCD, leur maturation va être permise grâce à l'acidification et la condensation de leur contenu *via* des V-ATPases et des aquaporines, respectivement. Au cours de leur maturation, les GSCD sont acheminés vers la périphérie cellulaire le long des microtubules et des filaments d'actine à l'aide de protéines motrices, telles que les kinésines et les myosines. Suite à la stimulation de la cellule, un influx calcique déclenche la fusion du GSCD avec la membrane plasmique permettant ainsi la sécrétion régulée neuroendocrine. Lors de cette fusion, la portion de membrane granulaire s'intègre à la membrane plasmique, permettant l'endocytose compensatrice, processus nécessaire au maintien de l'homéostasie cellulaire.

Au cours de ma thèse, les travaux que j'ai menés ont ainsi plus particulièrement contribué à démontrer que l'interaction de la CgA avec le PA de la membrane golgienne induit une déformation membranaire contribuant au bourgeonnement des GSCD, comme ce sera discuté dans la première partie de ce chapitre. Mes travaux de thèse ont également permis de débuter l'étude du rôle de l'interaction CgA/PA lors de l'exocytose et ont d'ores et déjà montré que la sécrétion régulée des cellules neuroendocrines entraîne la présence de CgA au niveau des sites exocytiques, comme rapporté dans la deuxième partie de ce chapitre. Enfin, dans le contexte de développement d'analogues de PA dans le cadre d'une collaboration avec les organo-chimistes du laboratoire COBRA (UMR 6014 CNRS, Mont-Saint-Aignan) et de mise au point de leurs conditions d'utilisation, j'ai également pu démontrer que la taille et la nature du fluorochrome à greffer sur les analogues conditionne leur suivi au sein des cellules neuroendocrines vivantes, données concluant ce chapitre.

I. L'interaction de la CgA avec le PA de la membrane golgienne induit une déformation membranaire contribuant au bourgeonnement des GSCD

Mon équipe d'accueil a montré que les régions terminales conservées de la CgA jouent un rôle clé dans la formation des GSCD contenant la CgA. En effet, la surexpression de la CgA dans des cellules non-endocrines COS7 entraîne l'apparition de structures « GSCD-like » contenant la CgA alors que la surexpression de la CgA dépourvue de ses régions terminales entraîne une formation significativement moindre de GSCD (Montero-Hadjadje et al., 2009). Par ailleurs, plusieurs études ont suggéré que la CgA est capable d'interagir avec les membranes cellulaires *via* les hélices α présentes au sein de sa séquence. C'est notamment le cas des travaux menés par Dondossola et collaborateurs qui ont montré que le peptide dérivé de l'extrémité N-terminale de la CgA, la vasostatine-1 (VS-1), est capable d'interagir avec la membrane plasmique de fibroblastes du fait de sa structure hélicoïdale (Dondossola et al., 2010). L'équipe de Karen B. Helle a quant à elle montré que la VS-1 est capable d'engager des liaisons électrostatiques et hydrophobes avec la phosphatidylsérine, la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine (Blois et al., 2006). Enfin, une étude *in silico* de la séquence de la CgA a permis de mettre en évidence la présence d'une structure en hélice α également au niveau de sa région C-terminale (Elias et al., 2010). Ces différents éléments nous ont amenés à étudier la capacité d'interaction de la CgA avec les phospholipides membranaires et à élucider l'impact de cette interaction sur la dynamique membranaire et la biogénèse des GSCD.

Au cours de la première partie de ma thèse, le potentiel de la CgA à interagir avec le PA et les phosphoinositides a été démontré à l'aide de *lipid strips*, des membranes de nitrocellulose commerciales sur lesquelles sont adsorbés différents types de lipides. Le PA étant impliqué dans la biogénèse des GSCD (Siddhanta and Shields, 1998), nous nous sommes intéressés à l'importance de ce phospholipide dans la formation des GSCD contenant la CgA. Nous avons ainsi surexprimé le domaine de liaison au PA (PA-Binding Domain, PABD) de la phosphodiestérase PDE4A1 au sein de cellules PC12 neuroendocrines dans l'objectif de réduire la capacité d'interaction de la CgA avec le PA au niveau des membranes golgiennes. En effet, le PABD de PDE4A1 a été montré comme interagissant avec le PA de la membrane du TGN au sein de cellules COS1 (Huston et al., 2006) et de macrophages RAW 264.7 (Kassas et al., 2017). Nous avons montré que le PABD de PDE4A1 couplé à la GFP présente bien une localisation golgienne et que celui-ci entraîne une diminution significative du nombre de GSCD contenant la CgA, sans pour autant avoir d'impact sur l'expression de la CgA. Qui plus est, la surexpression d'un construit exprimant le PABD muté de PDE4A1

couplée à la GFP (et donc, incapable de lier le PA), présente une localisation cytosolique et n'impacte pas la biogénèse des GSCD contenant la CgA, démontrant l'importance du PA golgien dans la formation des GSCD contenant la CgA.

Ensuite, nous avons analysé et comparé la composition en PA des compartiments golgiens et granulaires purifiés à partir de cellules COS7-CgA, cellules présentant des structures vésiculaires « GSCD-like » contenant la CgA, contrairement aux cellules COS7 sauvages naturellement dépourvues de CgA (Elias et al., 2012; Montero-Hadjadje et al., 2009). Une analyse lipidomique détaillée réalisée par spectrométrie de masse LC-MS/MS équipée d'une colonne d'affinité pour le PA a révélé la présence de 44 espèces distinctes de PA, et parmi ces 44 espèces, seules quelques-unes sont prépondérantes au sein des membranes golgiennes et granulaires de ces cellules : PA (36 : 1), PA (38 : 2), PA (38 : 6) et PA (40 : 6). En outre, nous avons comparé la composition en PA des membranes golgiennes des cellules COS7-WT et COS7-CgA afin d'étudier l'impact potentiel de l'expression de CgA sur la teneur en PA. Nous avons constaté que la membrane golgienne des cellules COS7-WT et COS7-CgA contiennent les mêmes espèces de PA prédominantes, à savoir PA (36 : 1), PA (38 : 2) et PA (40 : 6), avec un enrichissement significatif en PA (36 : 1) des membranes golgiennes des cellules COS7-CgA, aux dépens de PA (40 : 6). Les mêmes espèces majoritaires de PA sont également présentes dans les membranes granulaires des cellules neuroendocrines PC12. Ces résultats suggèrent que les espèces mono- et poly-insaturées PA (36 : 1), PA (38 : 2) et PA (40 : 6) sont cruciales pour la formation des GSCD, avec potentiellement un rôle distinct aux différentes étapes de la vie des GSCD.

Par ailleurs, l'utilisation de liposomes enrichis avec différents phospholipides, dont les espèces de PA identifiées à la membrane des GSCD, nous a permis de montrer une interaction spécifique entre la CgA provenant d'extraits de cellules COS7-CgA et le PA (36 : 1) et le PA (40 : 6), ainsi qu'une absence d'interaction entre la CgA et la PS ou la PC, données en accord avec celles obtenues lors de l'utilisation des *lipid strips*. De plus, la mise au point et l'utilisation de liposomes géants (Giant Unilamellar Vesicles, GUV) contenant ces mêmes espèces de PA nous a permis *(i)* de valider sur un modèle membranaire présentant une courbure moindre, se rapprochant de celle des membranes cellulaires, que la CgA interagit spécifiquement avec le PA (36 : 1) et le PA (40 : 6), et *(ii)* d'observer que la CgA provoque, de manière dose-dépendante, des déformations de la membrane des GUVs enrichis avec ces espèces de PA.

Afin de quantifier l'interaction CgA/PA, les techniques de titration calorimétrique isotherme (ITC) et de microscopie à force atomique (AFM) ont été utilisées. L'analyse des

caractéristiques thermodynamiques de l'interaction CgA/PA (36 : 1) à l'aide de l'ITC a confirmé l'interaction spécifique de la CgA avec les membranes enrichies en PA (36 : 1) et que cette interaction induit un remodelage membranaire. L'analyse à l'aide de l'AFM de ces bicouches membranaires supportées a révélé que l'enrichissement en PA (36 :1) augmente le nombre, la hauteur et la surface de microdomaines induits par la présence de CgA, résultants de l'agrégation de la CgA, de la déformation membranaire, de la formation de microdomaines ou d'une combinaison de ces phénomènes.

L'ensemble de ces résultats met en évidence que la CgA interagit spécifiquement avec les différentes espèces de PA prépondérantes des membranes golgiennes et granulaires et souligne le rôle central de l'interaction CgA/PA dans la dynamique membranaire.

Dans le but de caractériser le domaine d'interaction au PA (PABD) au sein de la CgA, nous avons comparé la structure de la CgA à celle de protéines ayant un PABD, telle que la phosphodiestérase PDE4A1. Cette analyse *in silico* a révélé la présence d'un site potentiel d'interaction avec le PA au niveau de la région C-terminale de la CgA, *h*$CgA_{364-381}$, riche en acides aminés chargés positivement et en acides aminés hydrophobes, caractéristiques des PABD (Tanguy et al., 2018b). Cette région inclue la séquence C-terminale de la catestatine ($CgA_{352-372}$), et possède une structure en hélice α. En utilisant des liposomes enrichis en PA, nous avons constaté que la $CgA_{352-381}$ se lie fortement au PA (36 : 1), contrairement à la région correspondant à la catestatine. Ces résultats indiquent non seulement que la séquence entière du PABD de la CgA est importante pour la liaison au PA, mais aussi que la protéolyse de la CgA, telle qu'elle peut se produire dans les GSCD et qui entraîne la formation de la catestatine ($CgA_{352-372}$), serait susceptible d'impacter cette liaison. Ainsi, l'interaction CgA/PA pourrait être modulée lors de la maturation des GSCD, ce qui contribuerait à la régulation de la sécrétion neuroendocrine.

Afin d'analyser le rôle de cette région dans la formation des GSCD, un plasmide codant pour la CgA privée du PABD couplée à la GFP a été généré, ce qui nous a permis d'observer une diminution significative du nombre de GSCD lors de l'expression de ce mutant au sein des cellules AtT20 neuroendocrines, comparativement à l'effet de l'expression de la CgA-GFP, démontrant que cette région de la CgA est impliquée dans la granulogénèse.

Les résultats que je viens de vous présenter suggèrent que dans des conditions physiologiques, la CgA, en interagissant *via* son PABD avec diverses espèces de PA (PA (36 : 1) et PA (40 : 6)), participe au réarrangement de la membrane du réseau *trans*-golgien, entrainant de ce fait, la formation de microdomaines enrichis en PA. Le PA possédant une

forme conique dans les conditions intra-golgiennes (Kooijman et al., 2003; Zegarlińska et al., 2018), cet enrichissement expliquerait la formation de courbures membranaires nécessaires au bourgeonnement des GSCD des cellules neuroendocrines.

Dans l'objectif d'étudier le rôle de l'interaction CgA/PA dans la granulogenèse au sein de cellules neurosécrétrices vivantes, nous avons inhibé la synthèse du PA par différentes stratégies. Dans la littérature, il est établi que la synthèse de PA au niveau golgien est en grande partie assurée par la PLD1, qui hydrolyse le PC en PA (Chen et al., 1997; Freyberg et al., 2001a, 2003; Siddhanta and Shields, 1998). De ce fait, nous avons choisi d'altérer la production de PA *via* la voie PLD dans nos modèles cellulaires en utilisant une approche pharmacologique et une approche d'invalidation génétique. L'inhibition pharmacologique de la PLD à l'aide du FIPI au sein de cellules COS7-CgA et PC12 a mis en évidence une diminution significative du nombre de GSCD. La PLD1 étant l'isoforme prépondérante assurant la synthèse de PA au niveau de l'appareil de Golgi, nous avons analysé et comparé la morphologie subcellulaire de cellules chromaffines provenant de souris KO pour la PLD1. Cette approche d'invalidation génétique a mis en évidence une diminution significative du nombre de GSCD, associée à leur malformation. Ces observations nous ont particulièrement interpelé puisque ces caractéristiques se rapprochent de celles des GSCD des cellules chromaffines provenant de souris KO CgA (Pasqua et al., 2016), indiquant que l'inhibition de l'expression de la PLD1 mime l'effet du déficit en CgA sur la biogenèse des GSCD. Ces observations suggèrent que la CgA et le PA généré par la PLD1 coopèrent lors de la formation des GSCD dans les cellules neuroendocrines.

L'ensemble de ces résultats met en lumière un nouveau mécanisme moléculaire crucial régissant la biogenèse des GSCD au sein des cellules neuroendocrines **(Figure n°30).** Ainsi, la CgA, en se liant avec les différentes espèces de PA golgiennes synthétisées par la PLD1, provoquerait un remaniement de la membrane du TGN, aboutissant à la formation de microdomaines enrichis en PA, qui, de par sa forme conique, entraîne la courbure membranaire initiant le bourgeonnement des GSCD contenant la CgA. Ce mécanisme interviendrait en complément des rôles assurés par les protéines cytosoliques, acteurs également essentiels à la biogenèse des GSCD et à la sécrétion neuroendocrine. En effet, les protéines cytosoliques telles que GOLPH3 (Rahajeng et al., 2019), les arfaptines (Cruz-Garcia et al., 2013; Gehart et al., 2012), le complexe acto-myosine 1b (Delestre-Delacour et al., 2017) ou encore la GTPase Arf6 (Vitale et al., 2002) sont également recrutées à la membrane du TGN pour assurer la formation des GSCD. La chronologie de leurs interventions reste à déterminer au regard du remaniement induit par l'interaction CgA/PA.

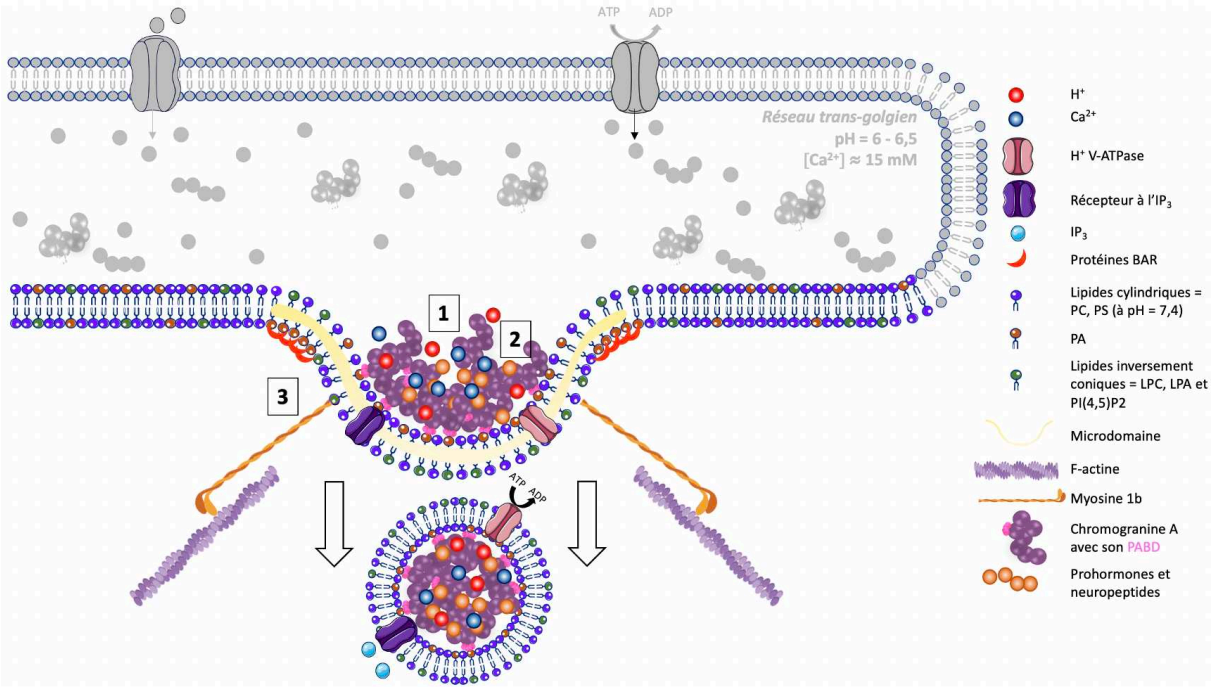


Figure n°30. Schéma récapitulant le rôle de l'interaction CgA/PA et des principaux acteurs moléculaires dans le bourgeonnement des granules de sécrétion à cœur dense. *(1)* Au niveau du TGN, sous conditions de pH acide et de forte concentration calcique *via* entre autres, le récepteur à l'IP_3, la CgA facilite la formation d'agrégats avec les prohormones/proneuropeptides. *(2)* Les agrégats interagissent avec le PA de la membrane du réseau *trans*-golgien *via* le PABD de la CgA. *(3)* Ces interactions entrainent un remodelage membranaire au niveau du TGN, puis la formation d'un microdomaine enrichi en PA. Ce remodelage membranaire génère une force afin d'initier le bourgeonnement des GSI. Le recrutement de protéines cytosoliques, telles que la protéine à domaine BAR Arfaptine 1 et le complexe d'actomyosine 1b (F-actine et myosine1b), vient en complément de la force générée par le remodelage membranaire afin de permettre le bourgeonnement des GSI.

Suite aux différents résultats mettant en évidence l'interaction CgA/PA de façon directe *in vitro via* l'utilisation de *lipid strips*, de GUVs, ou de *liposome flotation assay*, et de façon indirecte *in cellulo* en altérant la CgA ou le PA indépendamment, il convient dorénavant de visualiser cette interaction à l'échelle de la membrane golgienne au sein de cellules vivantes. Nous possédons d'ores et déjà un plasmide codant la CgA-GFP qui permet de suivre la CgA au sein des cellules. En revanche, pour suivre les différentes formes de PA (PA (36 : 1), (38 : 2) ou (40 : 6)) avec lesquelles la CgA interagit, aucun outil n'est disponible sur le marché à l'heure actuelle. Ainsi, dans le cadre d'une collaboration avec les organo-chimistes du laboratoire COBRA (UMR 6014 CNRS, Mont-Saint-Aignan), nous avons entrepris le développement de nouveaux outils moléculaires, consistant en la synthèse de différentes formes de PA biocompatibles et fluorescentes. Au cours de ma thèse, afin de préparer les conditions d'utilisation de ces sondes, j'ai utilisé des sondes PA fluorescentes commerciales. En effet, bien que ces sondes commerciales ne représentent pas nos espèces d'intérêt, elles se révèlent être des outils permettant d'appréhender le comportement d'un PA exogène dans un contexte cellulaire. Les mises au point réalisées avec ces sondes commerciales sont rapportées dans la partie III de ma discussion.

II. La sécrétion régulée des cellules neuroendocrines entraîne la présence de CgA au niveau des sites exocytiques

Mes travaux de thèse ont permis dans un premier temps de démontrer que l'interaction de la CgA *via* son PABD avec le PA de la membrane golgienne est nécessaire à la régulation du bourgeonnement des GSCD, et de ce fait, à leur formation au sein des cellules neurosécrétrices. De manière intéressante, il a été constaté par mon équipe d'accueil, en observant des cellules COS7 exprimant la CgA-GFP à l'aide de la microscopie à ondes évanescentes (TIRFM) que la cinétique de libération de la CgA-GFP présente un profil atypique : en effet, la durée de décroissance de la fluorescence des GSCD contenant la CgA-GFP est plus longue que celle observée pour des GSCD contenant le NPY-GFP, ce qui se manifeste par le fait que les sites d'exocytose restent visibles après fusion des GSCD contenant la CgA-GFP (**Figure n°31**). Ainsi, les phénomènes d'exocytose observés par mon équipe d'accueil au sein des cellules COS7 présentent des durées comprises entre 300 et 400 ms, ce qui est cohérent avec les durées mesurées pour l'exocytose des GSCD des cellules neuroendocrines (Allersma et al., 2004, 2006). De plus, après exocytose, le fait que l'intensité de fluorescence diminue lentement et ne disparait pas totalement au niveau du site d'exocytose suggère qu'une fraction des molécules de CgA-GFP reste adhérente à la membrane plasmique **(Figure n°31, A & B)**, contrairement à ce qui est observé pour les molécules de NPY-GFP, l'intensité de fluorescence chutant brutalement après exocytose jusqu'à disparaître, indiquant que toutes les molécules sont relarguées dans le milieu extracellulaire **(Figure n°31, C & D)**.

Par ailleurs, plusieurs études attribuent une fonction clé à la CgA au niveau de la membrane plasmique lors de l'exocytose. En effet, il a été démontré par l'équipe de Yoo en 2005 que la CgA interagit avec la syntaxine 1A et la synaptotagmine I, des protéines transmembranaires possédant un rôle primordial dans la formation du complexe de fusion, ce qui suggère une participation active de la CgA dans la mise en place et la régulation du complexe de fusion (Yoo et al., 2005). Une autre étude a mis en évidence que la CgA interagit avec les CAs et contrôle ainsi leur libération (Dominguez et al., 2014), mettant de nouveau en avant le rôle central de la CgA dans le contrôle de l'exocytose régulée neuroendocrine. Plus récemment, l'équipe de Ronald Holz a mis en lumière un rôle de la CgA dans la régulation de l'expansion du pore de fusion lors de l'exocytose des GSCD (Abbineni et al., 2019).

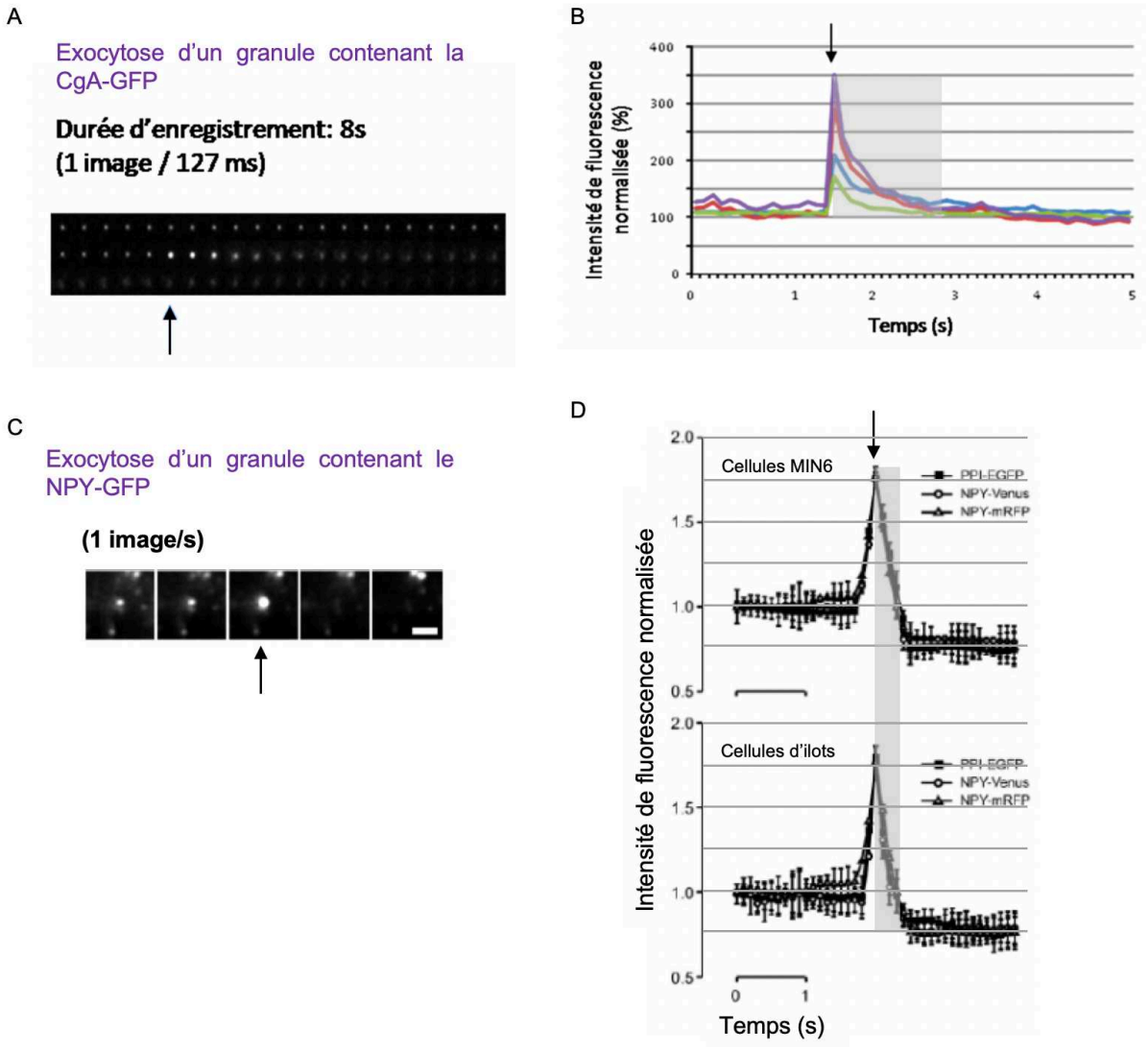


Figure n°31. Observation et analyse en TIRFM de l'exocytose des GSCD contenant la CgA-GFP ou le NPY-GFP au sein des cellules COS7 ou des cellules pancréatiques respectivement. *(A)* Série d'images obtenues au cours d'une acquisition en TIRFM montrant un GSCD contenant la CgA-GFP en cours d'exocytose. La flèche indique le début de l'exocytose. *(B)* Histogramme représentant l'intensité de fluorescence du GSCD mesurée au cours du temps. La fluorescence moyenne précédent l'exocytose est normalisée à 100 %. Les profils d'exocytose de 4 granules CgA-GFP ont été analysés. Adapté de la thèse de Charlène Delestre-Delacour, 2014. *(C)* Série d'images représentant un GSCD contenant le NPY-GFP au cours de l'exocytose. *(D)* Histogramme représentant l'intensité de fluorescence mesurée au cours du temps. Adapté de Tsuboi et al., 2006. Les zones grisées correspondent à la décroissance de la fluorescence après exocytose.

Suite à ces différentes données, nous nous sommes demandé si la CgA régule l'exocytose des GSCD du fait de sa capacité d'interaction avec le PA de la membrane plasmique. En effet, comme nous l'avons démontré dans la précédente étude, l'interaction entre la CgA et le PA généré par la PLD1 permet de générer une déformation de la membrane du TGN, entraînant le bourgeonnement des GSCD. Ainsi, les GSCD, une fois formés, contenant une fraction des molécules de CgA en interaction avec le PA de la membrane, sont acheminés vers la membrane plasmique à l'aide de protéines motrices le long des microtubules puis des filaments d'actine corticaux. La stimulation des cellules entraîne alors

la fusion des GSCD avec la membrane plasmique. Ce processus va entraîner la localisation des molécules de CgA, en contact avec le PA intra-granulaire, au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique, en contact avec le milieu extracellulaire. De ce fait, l'interaction CgA/PA qui régit la formation des GSCD peut être maintenue au niveau de la membrane plasmique, ce qui nous a conduit à rechercher la présence de ce complexe moléculaire à la membrane plasmique après exocytose, ainsi que le rôle qu'il pourrait y assurer **(Figure n°32)**.

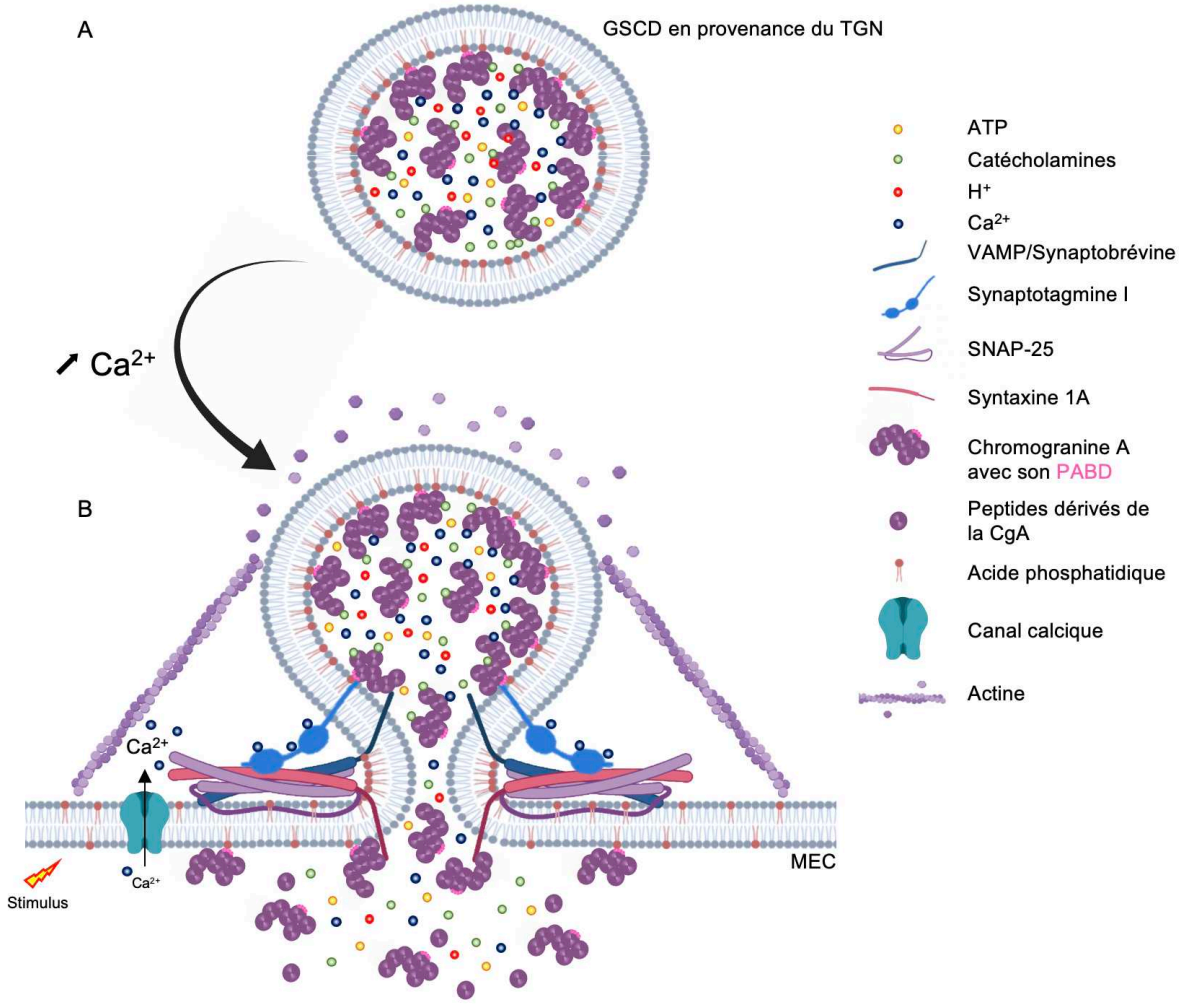


Figure n°32. Représentation schématique du mode d'action potentiel du complexe CgA/PA lors de l'exocytose au sein des cellules neuroendocrines. *(A)* Les GSCD, formés au niveau du TGN suite à l'interaction entre la CgA et le PA, et contenant des agrégats de CgA-CAs-Ca^{2+}, sont transportés le long des microtubules jusqu'au niveau du cortex d'actine où ils sont piégés. *(B)* Lors de la stimulation de la cellule, l'influx calcique induit la dépolymérisation partielle du cortex d'actine et la fusion du GSCD avec la membrane plasmique. Cette étape serait régulée par la CgA, du fait de son interaction avec des constituants clés du complexe de fusion, la syntaxine 1A, et la synaptotagmine I. Suite à l'intégration de la membrane granulaire à la membrane plasmique, les complexes CgA/PA se retrouveraient au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique. La fraction de molécules de CgA n'interagissant pas avec la membrane granulaire est quant à elle libérée dans le milieu extracellulaire (MEC) afin que la CgA et ses peptides dérivés assurent leurs différentes fonctions physiologiques.

Ainsi, nous avons commencé par rechercher si des molécules de CgA restent en contact avec la membrane plasmique suite à la stimulation des cellules. À cette fin, nous avons simulé des cellules chromaffines bovines en culture primaire par l'acétylcholine (ACh) puis placé dans le milieu extracellulaire des cellules vivantes un anticorps anti-CgA afin de détecter la CgA au niveau de la membrane plasmique par immunocytochimie couplée à la microscopie confocale. De cette manière, nous avons pu observer une colocalisation entre des clusters de CgA et de VMAT2, transporteur des CAs provenant de la membrane granulaire et se retrouvant au niveau de la membrane plasmique suite à la fusion des GSCD. Cette observation suggère que des molécules de CgA sont localisées à la membrane plasmique suite à la stimulation des cellules et qu'elles dérivent bien de la fusion des GSCD avec la membrane plasmique. Par ailleurs, nous avons étudié la relation spatiale entre la CgA et les sites d'exocytose en analysant la distribution de la CgA au niveau de la membrane plasmique des cellules chromaffines bovines stimulées à l'aide de la technique d'immunogold couplée à la microscopie électronique à transmission (MET). Une détection de la DBH a également été réalisée du fait de sa présence au niveau de la membrane granulaire et ainsi au niveau de la membrane plasmique après exocytose des GSCD (Gabel et al., 2020). Ainsi, une colocalisation entre CgA et DBH au niveau des spots exocytiques a pu être observée, confirmant que la CgA est bien présente au niveau de la membrane plasmique et qu'elle résulte de l'insertion de la membrane granulaire suite à la fusion des GSCD.

Au sein des GSCD, comme au sein du TGN, la CgA interagit avec le calcium ce qui contribue à la structuration de la protéine en hélices α et feuillets β (Aunis and Metz-Boutigue, 2001; Yoo, 1996). La structure secondaire de la CgA est nécessaire à son interaction avec les différents composants granulaires, qu'ils soient solubles (CAs) ou membranaires (synaptotagmine I, syntaxine 1A, lipides). Afin de confirmer la capacité d'interaction de la CgA avec la membrane plasmique après exocytose des GSCD, nous avons évalué l'impact de la chélation du calcium extracellulaire par l'EGTA (acide Éthylène Glycol Tetra Acétique) sur les cellules chromaffines en culture. Ainsi, après nous être assurés que la stimulation de ces cellules par l'ACh entraîne une augmentation de la libération de CgA dans le milieu extracellulaire, ces cellules stimulées sont ré-incubées dans un milieu contenant l'EGTA. De manière très intéressante, l'analyse de ce milieu d'incubation a révélé la présence de CgA, ce qui confirme que des molécules de CgA sont associées à la membrane plasmique après fusion des GSCD.

Nous nous sommes par ailleurs intéressés *(i)* au rôle du PA dans l'association de la CgA à la membrane plasmique et *(ii)* à la contribution de l'interaction CgA/PA dans la régulation de la sécrétion neuroendocrine. Le traitement des cellules chromaffines par le FIPI,

un inhibiteur pharmacologique de PLD1 et PLD2, enzymes synthétisant le PA impliqué dans la voie de sécrétion régulée (Freyberg et al., 2001a, 2003; Zeniou-Meyer et al., 2007b), n'a pas d'impact sur la sécrétion basale, mais diminue significativement la sécrétion régulée de CAs et de CgA.

L'équipe de Ronald Holz ayant démontré dans une étude récente que la CgA ralentit l'expansion du pore de fusion en stabilisant la courbure membranaire post-fusion (Abbineni et al., 2019), nous postulons que lorsque le PA n'est plus présent au niveau de la membrane plasmique, la CgA n'y est plus associée et ne joue plus son rôle de stabilisateur du pore de fusion. Or, la portion membranaire correspondant à la membrane granulaire doit être extraite de la membrane plasmique *via* l'endocytose compensatrice afin de maintenir l'homéostasie cellulaire (Bittner et al., 2013). En effet, une des fonctions principales de cette endocytose est de permettre aux cellules de maintenir leur taille globale suite à une stimulation intense, puisque par exemple, l'exocytose de 10 % des GSCD dans une cellule chromaffine va augmenter sa surface membranaire de 50 % en absence d'endocytose (Abbineni et al., 2019). Pour que l'endocytose compensatrice puisse avoir lieu, la courbure de la membrane post-fusion doit être préservée afin de permettre un recrutement localisé de protéines intervenant dans l'endocytose (Roux et al., 2010). Ainsi, la CgA, stabiliserait la courbure membranaire au niveau des sites de fusion, ce qui favoriserait le recrutement des protéines impliquées dans l'endocytose compensatrice. De ce fait, lorsque la synthèse de PA est altérée, la CgA n'est plus présente au niveau des spots exocytiques, altérant de ce fait l'endocytose compensatrice et l'homéostasie cellulaire. Dans un réflexe de restauration de l'homéostasie, la voie de sécrétion régulée de ces cellules serait alors freinée, ce qui expliquerait la diminution significative de la sécrétion hormonale.

Des études préliminaires permettent d'appuyer cette hypothèse, puisque nous avons observé que les spots exocytiques contenant la CgA peuvent être rapidement endocytés au sein de la cellule chromaffine bovine **(Figure n°33)**, suggérant que la CgA, *via* son interaction avec le PA, aurait un rôle clé dans la mise en place de l'endocytose compensatrice au sein des cellules neuroendocrines. Cette hypothèse est renforcée par le rôle établi d'une autre granine, la CgB, dans l'endocytose couplée à l'exocytose régulée au sein des cellules PC12 (Bauer et al., 2004; Pimplikar and Huttner, 1992).

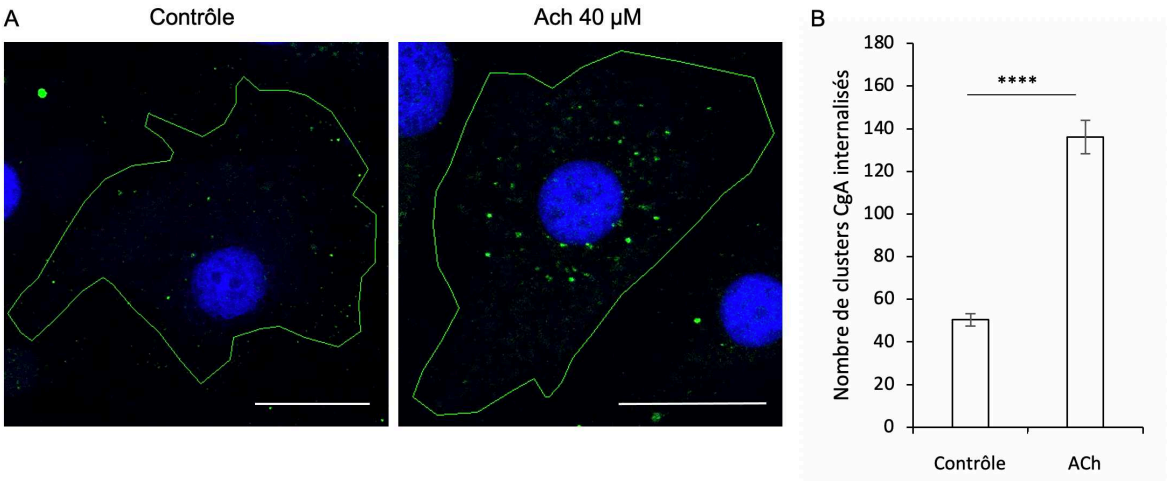


Figure n°33. Les clusters de CgA situés à la membrane plasmique après exocytose régulée sont internalisés. *(A)* Des cellules chromaffines bovines vivantes en condition contrôle ou stimulée avec 40 µM d'ACh ont été incubées avec un anticorps anti-CgA afin de marquer la CgA à la membrane plasmique (45min, 4°C). Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C pendant 30 minutes, puis fixées et traitées pour l'immunofluorescence. Des images représentatives de l'observation des cellules à l'aide de la microscopie confocale sont montrées pour chacune des conditions. *(B)* L'histogramme représente le nombre moyen de clusters CgA internalisés pour chaque condition (n = 6, 90 cellules par condition). La condition contrôle correspond aux cellules non stimulées. **** P <0,0001, test de Mann-Whitney. Barres d'échelle = 25 µm.

Une autre hypothèse quant au rôle de l'interaction CgA/PA au niveau de la membrane plasmique est que la CgA maintienne en l'état la portion de membrane granulaire, en limitant la diffusion de ses composants moléculaires au sein de la membrane plasmique, et ainsi, permette la mise en place de l'endocytose compensatrice. De ce fait, en l'absence de PA synthétisé *via* la PLD, la CgA n'assurerait plus ce rôle, impactant ainsi l'exocytose régulée et l'endocytose compensatrice associée.

Enfin, les résultats présentés dans la première partie de ma discussion démontrant que l'inhibition génétique ou pharmacologique du PA généré par la PLD entraîne une diminution significative du nombre de GSCD, il est tentant de penser que cela puisse également expliquer l'altération de la sécrétion régulée de CAs et de CgA par les cellules chromaffines.

Bien que ces différents résultats doivent être complétés afin de démontrer de manière directe le lien entre la CgA et le PA dans le contrôle de l'exocytose régulée, plusieurs études ont d'ores et déjà démontré que chacun de ces acteurs est impliqué dans la sécrétion neuroendocrine. La CgA a un rôle démontré dans la formation du complexe de fusion *via* son interaction avec différents partenaires clés du complexe SNARE (Yoo et al., 2005) et dans l'expansion du pore de fusion (Abbineni et al., 2019). En ce qui concerne le PA, la stimulation des cellules neuroendocrines entraîne la relocalisation/production de diverses espèces de PA au niveau de la membrane plasmique. Les PA poly-insaturés y contrôlent la stabilité et l'expansion du pore de fusion tandis que les PA mono-insaturés contrôlent le nombre d'événements exocytiques (Tanguy et al., 2020). Ainsi, la poursuite de nos travaux requiert

des outils moléculaires qui nous permettront de suivre le PA au niveau des membranes cellulaires, afin de visualiser et d'étudier l'implication de l'interaction CgA/PA dans le contrôle de la voie de sécrétion régulée. Pour atteindre cet objectif, nous utiliserons les différentes espèces de PA fluorescentes biocompatibles en cours de développement par les chimistes du laboratoire COBRA. Ces différents outils sont détaillés dans la partie suivante.

III. La taille et la nature du fluorochrome porté par les analogues de PA conditionnent leur insertion et leur suivi au sein des cellules vivantes

Afin de pouvoir suivre, visualiser et quantifier l'interaction CgA/PA au niveau de la membrane du TGN et de la membrane plasmique de cellules neuroendocrines, la synthèse de différentes espèces de PA biocompatibles est en cours dans le cadre de la collaboration établie avec les organo-chimistes de l'UMR 6014 CNRS COBRA (Mont-Saint-Aignan). Dans l'objectif d'éviter d'encombrer la tête phosphate ou de modifier les chaines d'acides gras portées par les PA, et ainsi d'impacter l'activité biologique de ces sondes, nos partenaires chimistes ont fait le choix de réaliser le greffage des différents groupements au niveau du glycérol. Ces sondes seront de trois natures. Le greffon pourra être une molécule fluorescente afin de visualiser la distribution de ces analogues ainsi que leurs interactions avec des partenaires protéiques également fluorescents, à l'aide des microscopes à notre disposition au sein de la plate-forme d'imagerie cellulaire PRIMACEN. Néanmoins, si le fluorochrome porté par les analogues de PA empêche l'insertion des sondes au sein des bicouches membranaires, nous pourrons utiliser la *click chemistry*, dont nos collaborateurs possèdent l'expertise, afin de réaliser le couplage entre la sonde PA intégrée aux membranes et le fluorochrome au sein des cellules. Si les formes de PA fluorescentes sont hydrolysées *in cellulo*, ces sondes pourront être inactivées grâce à l'emprisonnement de la tête phosphate du PA par un groupement photo-clivable ou « cage ». L'application d'une irradiation lumineuse ciblée permettra la destruction de cette « cage », et ainsi la formation de PA fonctionnels, que nous pourrons localiser à l'aide de protéines reconnaissant le PA au sein de divers compartiments cellulaires (Spo20p, PDE4A1 ou encore Opi1p, couplées à la GFP), développées et mises à notre disposition par notre collaborateur, le Dr Nicolas Vitale (UPR 3212 CNRS, INCI Strasbourg). Enfin un autre type de sonde permettra d'identifier les partenaires protéiques du PA par spectrométrie de masse. Ces sondes possèdent un photo-crosslinker qui, lorsqu'il sera illuminé, pourra créer des liaisons covalentes avec les partenaires protéiques. Les complexes formés pourront être purifiés et étudiés en LC-MS/MS, l'objectif ici

étant notamment de vérifier la présence de la CgA parmi les partenaires, mais d'autres protéines clés, impliquées dans la sécrétion neuroendocrine, pourraient être identifiées.

Le développement de ces analogues s'avérant plus complexe qu'initialement prévu, j'ai utilisé durant ma thèse des PA fluorescents commerciaux **(Figure n°34)** afin de mettre au point le protocole d'utilisation de ces sondes sur différents types de cellules**.** Ces sondes commerciales ont cependant des inconvénients non négligeables : *(i)* elles ne correspondent pas aux espèces de PA d'intérêt (PA (36 : 1), PA (38 : 2), PA (40 : 6)), et *(ii)* le fluorochrome porté par ces sondes est situé au niveau des chaines d'acides gras des PA, pouvant ainsi impacter la structure et l'organisation du PA au sein des membranes. Malgré tout, ces analogues de PA fluorescents sont les seuls disponibles sur le marché à l'heure actuelle, et sont de ce fait des outils précieux afin d'appréhender le comportement de PA fluorescent exogène au sein de cellules vivantes.

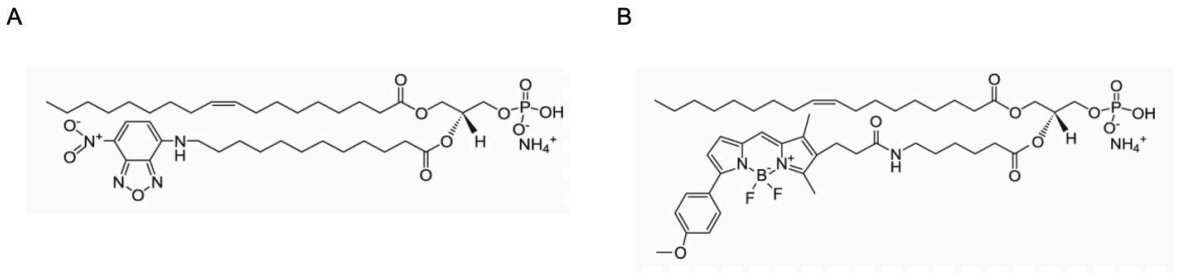


Figure n°34. Structure des analogues de PA fluorescents commerciaux. **(A)** Sonde PA (18:1-12:0 ou 30:1) couplée au fluorochrome NBD (NitroBenzoxaDiazole). **(B)** Sonde PA (18:1-6:0 ou 24:1) couplée au fluorochrome TMR (TetraMethylRhodamine).

Dans cette optique, différents protocoles expérimentaux ont été testés. Un protocole élaboré à partir de celui de l'équipe de Gomez-Cambronero (Henkels et al., 2016) est détaillé dans la partie matériels et méthodes de ce manuscrit. Cette mise au point a permis d'identifier la concentration de PA-NBD et PA-TMR à utiliser afin d'obtenir un équilibre entre un marquage correct observable en microscopie confocale et l'absence de toxicité cellulaire. Différents temps d'incubation ont été testés afin de suivre la cinétique de pénétration des lipides au sein des cellules.

Concernant le PA-NBD, nous constatons qu'à une concentration de 0,5 µg/mL, le lipide pénètre rapidement au sein des cellules non sécrétrices COS7, sans créer de dommages cellulaires apparents, et atteint sa localisation définitive en 10 minutes **(Figure n°35, A).** Ces constatations ne peuvent cependant pas être élargies aux cellules COS7-CgA et aux cellules AtT20. En effet, au bout de 15 minutes, à la même concentration, le PA-NBD est localisé presque exclusivement au niveau périphérique, et c'est seulement après 30 minutes que le lipide commence à pénétrer au sein des cellules, même si le marquage reste encore

majoritairement au niveau de la membrane plasmique **(Figure n°35, B et C)**. Après une heure d'incubation, la localisation est la même. Au sein des cellules PC12 et des cellules chromaffines bovines, nous remarquons également que le PA-NBD commence à pénétrer seulement après 15 minutes d'incubation mais il semble être intégré dans des structures internes à partir de 30 minutes, sans différence notable par la suite **(Figure n°35, D et E)**.

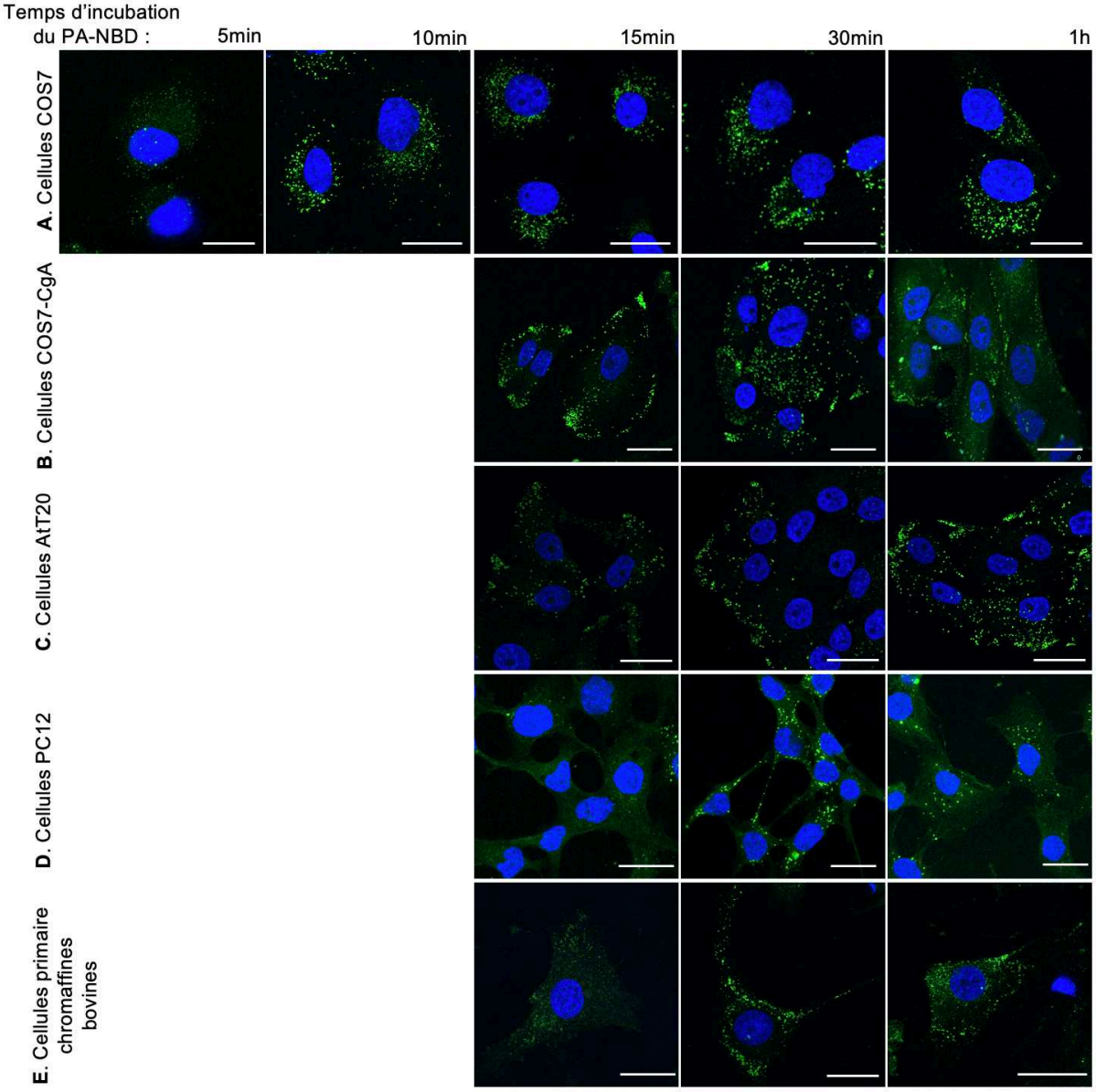


Figure n°35. Localisation du PA-NBD au sein de différentes cellules. Analyse à l'aide de la microscopie confocale de la localisation du PA-NBD (0,5 µg/mL) après différents temps d'incubation (5, 10, 15, 30 minutes ou 1 heure) au sein des lignées COS7 **(A)**, COS7-CgA (**B**), AtT20 **(C)**, PC12 **(D)** et des cellules chromaffines bovines **(E)**. Les emplacements où des images sont manquantes sont dus à l'absence de marquage des cellules par le PA-NBD. Le marquage des noyaux est réalisé par le DAPI. Barres d'échelle = 25 µm.

Ces observations mettent en exergue *(i)* que le comportement du PA-NBD est totalement différent au sein des cellules non sécrétrices (COS7) et des cellules sécrétrices

(COS7-CgA, AtT20, PC12 et chromaffines), et *(ii)* que la localisation *in cellulo* de ce lipide fluorescent est dépendant du type cellulaire. De manière intéressante, en comparant la localisation du PA-NBD au sein des cellules COS7 et des cellules COS7-CgA, il semble que l'expression de la CgA soit capable à elle seule d'entrainer une localisation périphérique du PA-NBD, ce qui laisse penser que l'interaction entre la CgA et le PA à la membrane plasmique pourrait influencer l'incorporation des sondes PA dans les cellules.

Concernant le PA-TMR, cet analogue possède la même chaine d'acides gras insaturée en position *sn-1* que le PA-NBD mais des différences au niveau de la position *sn-2* (chaine d'acides gras plus courte, 6 carbones au lieu de 12 pour le PA-NBD sans doute pour compenser la plus grande taille du TMR, fluorochrome émettant dans le rouge), ce qui peut expliquer une cinétique de pénétration radicalement différente du lipide au sein des cellules. A une concentration en deçà de 5 µg/mL, aucun marquage n'est visible, que ce soit dans les cellules COS7 ou les chromaffines bovines**.** Par ailleurs, contrairement au PA-NBD qui pénétrait en moins de 10 minutes dans les cellules COS7, aucun marquage n'est observable dans ces cellules avant 30 minutes avec le PA-TMR. La destination finale du PA-TMR semble être atteinte seulement après 2 heures d'incubation **(Figure n°36)**. Au sein des cellules chromaffines bovines, un faible marquage est uniquement observé au bout de 2 heures.

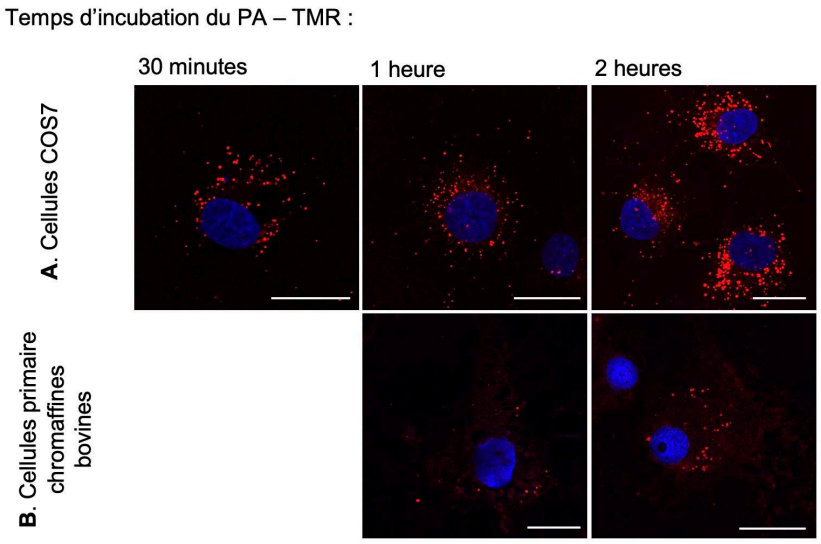


Figure n°36. Localisation du PA-TMR au sein de différentes cellules. Analyse à l'aide de la microscopie confocale de la localisation du PA-TMR (5 µg/mL) après différents temps d'incubation (30 minutes, 1 ou 2 heures) au sein des cellules COS7 **(A)** et des cellules chromaffines bovines **(B)**. L'emplacement où l'image est manquante est du à l'absence de marquage par le PA-TMR. Le marquage des noyaux est réalisé par le DAPI. Barres d'échelle = 25 µm.

Enfin, dans le but de caractériser le mécanisme d'insertion des PA fluorescents dans les cellules, des cellules COS7 et COS7-CgA ont été transfectées avec un plasmide codant

pour la clathrine couplée à la DsRed puis incubées avec du PA-NBD pendant 15 minutes, ce qui nous a permis de constater qu'aucune colocalisation entre le marquage PA-NBD et la clathrine a été observée en périphérie cellulaire. Cette observation révèle que les sondes PA intègrent les cellules *via* une voie indépendante de la clathrine **(Figure n°37)**. Néanmoins, ces expériences ayant été réalisées sur des cellules non-stimulées, il conviendra d'analyser la pénétration des sondes PA au sein de cellules neuroendocrines stimulées.

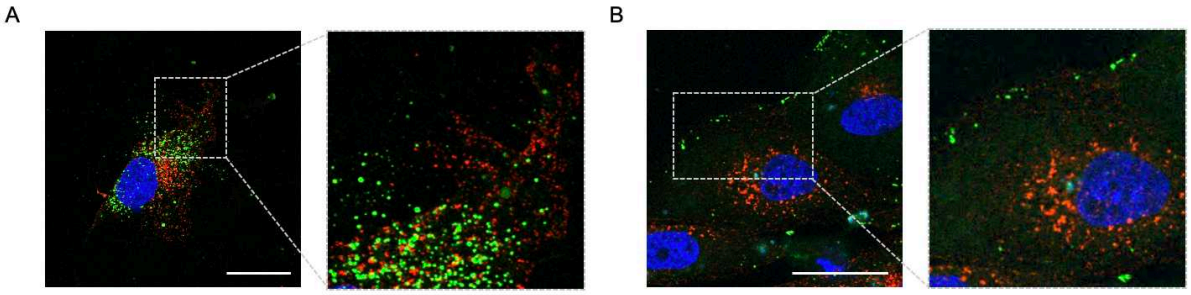


Figure n°37. L'internalisation du PA-NBD n'est pas dépendante de la clathrine. Analyse à l'aide de la microscopie confocale de la localisation de la clathrine-DsRed et du PA-NBD (0,5 µg/mL) à la membrane plasmique après 15 minutes d'incubation, au sein des cellules COS7 **(A)** et COS7-CgA **(B)**. Le marquage des noyaux est réalisé par le DAPI. Barres d'échelle = 25 µm.

En conclusion de cette dernière partie, les données que nous avons obtenues en utilisant les sondes PA commerciales nous ont permis d'appréhender certains paramètres afin d'optimiser la synthèse des sondes PA par les organo-chimistes avec qui nous collaborons. En effet, nous avons pu constater que la taille du fluorochrome porté par la sonde PA a un impact non-négligeable sur la localisation et l'internalisation de la sonde au sein des cellules, puisque des différences flagrantes ont été observées entre le PA-NBD et le PA-TMR. Afin de nous affranchir de ce phénomène, les organo-chimistes ont décidé de greffer un fluorochrome de petite taille au niveau du glycérol du PA, dans l'objectif de diminuer au maximum l'encombrement du PA, et ainsi favoriser son insertion au sein des membranes cellulaires et son interaction potentielle avec les protéines environnantes. Nos expériences ont également permis d'orienter le choix vers un fluorochrome qui permettra le suivi de la sonde PA en microscopie confocale et microscopie STED (StimulaTed-Emission-Depletion), en décidant d'éviter le NDB, qui photoblanchit très rapidement et limite donc de ce fait les acquisitions en continu sur cellules vivantes. Ainsi, nous nous sommes accordés sur le choix de l'Alexa-488, qui remplit ces différents critères, en tant que fluorochrome à coupler au niveau du glycérol des espèces de PA d'intérêt qui seront synthétisées.

CONCLUSIONS
&
PERSPECTIVES

Partie IV : Conclusions & perspectives

L'élucidation des mécanismes moléculaires permettant la mise en place de la voie de sécrétion régulée au sein des cellules neuroendocrines est indispensable pour comprendre les dérégulations de la sécrétion hormonale observées dans de nombreuses pathologies, telles que les tumeurs neuroendocrines (et l'hypertension artérielle associée dans le cas des phéochromocytomes), le diabète ou encore les maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer ou sclérose latérale amyotrophique). Mes travaux de thèse se sont inscrits dans ce contexte en contribuant à l'élucidation du mécanisme moléculaire d'action de la CgA, et plus particulièrement le rôle de son interaction avec le PA membranaire dans la formation et l'exocytose des GSCD, organites clés de la sécrétion neuroendocrine.

Mon travail de thèse, visait dans un premier temps, à étudier les mécanismes moléculaires permettant à la CgA de régir la formation des GSCD, organites permettant l'empaquetage sélectif des hormones protéiques à partir de la membrane du TGN au sein des cellules neuroendocrines. Le bourgeonnement des GSCD étant dépendant des réarrangements moléculaires de la membrane du TGN, nous avons focalisé notre attention sur la capacité de la CgA à interagir avec les lipides membranaires. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une liaison spécifique entre la CgA et plusieurs espèces de PA (PA (36 : 1), (38 : 2) et (40 : 6)), identifiées et prédominantes au niveau de la membrane du TGN et des GSCD. À l'aide du modèle des GUVs, nous avons mis en évidence que l'interaction CgA/PA induit des déformations de la membrane de GUVs enrichis avec les PA (36 : 1) et (40 : 6). À l'aide d'une analyse *in silico*, nous avons déterminé une région au niveau de la région C-terminale de la CgA comme étant un domaine potentiel d'interaction avec le PA (PABD) puis nous avons montré que ce PABD est nécessaire au bourgeonnement des GSCD au sein des cellules neuroendocrines. Enfin, l'inhibition génétique ou pharmacologique de la voie de synthèse du PA via la PLD, impliquée dans la voie de sécrétion régulée (Freyberg et al., 2001b; Zeniou-Meyer et al., 2007b), a entraîné une altération de la biogénèse des GSCD. Ces résultats ont démontré que le PA est un partenaire crucial de la CgA dans l'initiation du bourgeonnement des GSCD contenant la CgA, et par conséquent, dans la mise en place de la voie de sécrétion régulée des cellules neuroendocrines. La suite de cette étude se concentre sur la visualisation de l'interaction entre la CgA et le PA au niveau de la membrane du TGN, puis dans la formation des GSCD, au sein des cellules neurosécrétrices vivantes. À cette fin, des analogues

biocompatibles des espèces de PA que nous avons identifiées à la membrane golgienne et granulaire sont en cours de synthèse. Les sondes PA fluorescentes nous permettront de suivre, au sein de cellules neuroendocrines vivantes exprimant la CgA couplée à la GFP, l'interaction CgA/PA au niveau du TGN et son implication dans la formation des GSCD. Si le fluorochrome situé au niveau du glycérol du PA altère sa fonction ou sa localisation, nous utiliserons de manière alternative des sondes PA photoactivables (tête phosphate cagée). Ces lipides présentant une tête phosphate cagée sont de ce fait inactifs, et pourront ainsi être internalisés au sein des cellules pour être ensuite activés (décagés) à l'aide d'une illumination UV ciblée. Ces sondes PA pourront alors être localisées dans les cellules surexprimant la PDE4A1 couplée à la GFP, PDE4A1 étant une phosphodiestérase s'associant spécifiquement avec le PA golgien (Baillie et al., 2002; Kassas et al., 2012, 2017).

Dans un second temps, mon travail de thèse a porté sur l'implication de l'interaction CgA/PA au cours du processus d'exocytose régulée. Ce travail est toujours en cours et a pour vocation de mettre en évidence le rôle de cette interaction au niveau de la membrane plasmique. Différents aspects ont d'ores et déjà pu être démontrés. En effet, nous avons montré que la stimulation cholinergique des cellules chromaffines entraîne la localisation d'une fraction des molécules de CgA au niveau de la membrane plasmique. Qui plus est, les clusters membranaires auxquels sont associées les molécules de CgA contiennent le transporteur de monoamines VMAT2, suggérant ainsi que la CgA détectée à la membrane plasmique provient de la fusion des GSCD provoquée par la stimulation. L'observation de la face interne de la membrane plasmique des cellules chromaffines stimulées par la nicotine à l'aide de la microscopie électronique à transmission couplée à l'immunogold, a révélé la présence de CgA au niveau des sites exocytiques, confirmant que la CgA est plus précisément présente au niveau des sites de fusion des GSCD. Par ailleurs, la chélation du calcium extracellulaire de cellules chromaffines stimulées entraîne le relargage de la CgA dans le milieu extracellulaire, signifiant que la CgA, du fait de sa structure secondaire dépendante de sa liaison au calcium, interagit bien avec la membrane plasmique après fusion des GSCD.

Par ailleurs, nous avons observé que l'inhibition de la synthèse du PA généré par les PLD au sein des cellules chromaffines entraîne une diminution de la sécrétion régulée de CgA et de CAs. Il serait dorénavant intéressant d'étudier l'effet de l'inhibition spécifique de PLD1 et PLD2 afin d'identifier la voie de synthèse du PA impliquée dans la régulation de la sécrétion de CgA et de CAs.

La suite de l'étude se concentre actuellement sur la mise en évidence de façon directe de l'interaction CgA/PA au niveau de la membrane plasmique ainsi que sur le rôle de ce

complexe moléculaire lors de l'exocytose. Afin d'élucider la présence de cette interaction au niveau de la membrane plasmique, nous traiterons des cellules chromaffines par le FIPI ou par des inhibiteurs spécifiques de PLD1 et PLD2, les stimulerons puis les incuberons avec des anticorps anti-CgA dans le milieu extracellulaire afin d'analyser l'impact de l'absence des formes de PA synthétisées *via* ces voies enzymatiques sur la présence de CgA à la membrane plasmique après exocytose. Nous examinerons également l'impact de l'inhibition de la synthèse de ce PA par les voies PLD sur l'endocytose compensatrice au sein des cellules chromaffines. Pour visualiser cette interaction, nous étudierons, au sein de cellules chromaffines stimulées, la co-localisation entre les spots exocytiques marqués par les anticorps anti-CgA et les différentes espèces de sondes de PA fluorescentes synthétisées. Ces expériences nous permettront également de mettre en évidence si certaines formes de PA sont plus propices à être engagées dans l'interaction avec la CgA au niveau de la membrane plasmique. Ces complexes formés par la CgA et les différentes formes de PA fluorescentes pourront également être analysés lors de l'endocytose compensatrice, dans des cellules fixées à l'aide de la microscopie confocale, mais également dans les cellules vivantes, en utilisant les microscopies de super-résolution STED et TIRF. Enfin, l'interaction CgA/PA pourra être quantifiée en utilisant, dans le cadre d'une collaboration établie avec le Dr Didier Marguet du CIML à Marseille, la spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS), une technique permettant de détecter les variations d'intensité de fluorescence consécutives à l'interaction entre deux partenaires fluorescents au niveau membranaire.

Lorsque l'interaction CgA/PA sera confirmée au sein des cellules neuroendocrines vivantes à l'aide de ces différentes techniques, nous nous intéresserons à l'impact de cette interaction sur le pore de fusion, puisque chacun de ces acteurs moléculaires a été démontré dans la littérature comme possédant un rôle dans la formation et l'expansion du pore de fusion au sein des cellules chromaffines. La caractérisation des pores de fusion pourra être réalisée à l'aide de la microscopie à force atomique (AFM) dans des cellules chromaffines pré-traitées ou non par le FIPI et/ou des inhibiteurs spécifiques de PLD1 ou PLD2 puis stimulées. La technique d'AFM pouvant être couplée à un immunogold (Tsai et al., 2008), ce protocole permettra, en plus de détecter et mesurer les pores de fusion en fonction de la topographie membranaire, d'analyser la présence de CgA au niveau de ces pores avec une résolution supérieure à celle d'un microscope confocal.

Afin de caractériser l'impact de l'interaction CgA/PA sur la cinétique du pore de fusion lors de l'exocytose des GSCD, nous observerons à l'aide de la microscopie TIRF la fusion des GSCD avec la membrane plasmique au sein de cellules chromaffines vivantes surexprimant la CgA ou la CgAΔPABD (CgA dépourvue du domaine de liaison au PA) couplées à la GFP

(Carmon et al., 2020) ou à la pHluorin (protéine fluorescente lors de l'exocytose car sensible au pH, constructions en cours). Nous pourrons alors comparer les profils exocytiques générés par la CgA sauvage et par la CgA dépourvue du PABD, du point de vue de la durée de formation, de l'expansion et du nombre de pores de fusion, et ainsi en déduire le rôle de l'interaction CgA/PA. Ces différentes caractéristiques des pores de fusion seront également suivies sur des cellules chromaffines traitées avec le FIPI ou les inhibiteurs spécifiques des PLD1 ou PLD2. Si le profil d'exocytose est altéré suite à ces traitements, une expérience de restauration sera envisagée en ajoutant différentes formes de PA dans le milieu de culture des cellules, afin d'identifier les formes de PA avec lesquelles la CgA interagit dans le contrôle du pore de fusion.

Enfin, dans le cadre de la collaboration avec l'équipe du Dr. Nicolas Vitale (UPR 3212 CNRS, Strasbourg), il est envisagé par mon équipe d'accueil d'acquérir des souris dont le gène *PLD1* a été invalidé afin d'analyser leurs cellules chromaffines et déterminer si l'absence de PA généré par la voie PLD1 a des répercussions sur la localisation de la CgA, notamment au niveau de la membrane plasmique de ces cellules. Par ailleurs, l'organisation moléculaire des pores de fusion après stimulation des cellules chromaffines des souris KO PLD1 pourra également être analysée à l'aide des techniques de super-résolution précédemment évoquées.

Pour conclure, cette thèse a contribué à la compréhension des mécanismes d'action de la CgA dans la formation des GSCD, organites régissant la sécrétion hormonale. Elle a également apporté des éléments de compréhension quant à la manière dont la CgA contribuerait à la fusion des GSCD au cours de l'exocytose. L'élucidation de la place de la CgA et plus particulièrement de son interaction avec le PA, un phospholipide aux fonctions pléiotropes, dans les mécanismes moléculaires de la sécrétion régulée devrait permettre la compréhension de diverses situations physiopathologiques. Par exemple, des taux circulants de CgA sont anormalement élevés chez les patients atteints de tumeurs neuroendocrines (telles que le phéochromocytome, les tumeurs carcinoïdes de l'estomac, de l'intestin et du poumon et les tumeurs hypophysaires…), ce qui fait de la CgA un outil de diagnostic et de pronostic essentiel dans la prise en charge de ces patients. La sécrétion anormale de CgA favorise le développement du microenvironnement tumoral et diminue la réponse de la tumeur neuroendocrine aux thérapies mises en place (Corti, 2010). Par ailleurs, dans le cas des phéochromocytomes, les patients présentent non seulement une élévation du taux circulant de CgA mais également des CAs, ce qui est à l'origine d'hypertension artérielle (Guérin et al., 2010).

Les membres de la famille des PLD sont également associés au processus de

tumorigenèse. En effet, l'inactivation de la PLD1 dans l'environnement tumoral (xénogreffes de cellules de mélanome, carcinome pulmonaire ou cancer mammaire) chez la souris entraîne une diminution de la néovascularisation et de la croissance tumorale associée (Chen et al., 2012), et l'inactivation pharmacologique ou génétique de la PLD1 perturbe la tumorigenèse spontanée des modèles murins de cancer colorectal $Apc^{Min/+}$ (mutation entraînant une activation de la voie Wnt/β-caténine) (Kang et al., 2015).

L'ensemble de ces observations justifie l'intérêt de l'élucidation des mécanismes moléculaires impliquant la CgA et le PA dans la régulation de la sécrétion hormonale afin de mieux comprendre le développement de pathologies en lien avec le tissu neuroendocrine, et ainsi proposer des alternatives en termes de stratégies thérapeutiques.

MATÉRIELS & MÉTHODES

Partie V : Matériels & méthodes

Dans cette section, je vais me focaliser sur la présentation des techniques auxquelles j'ai contribué durant ma thèse. Les protocoles que j'ai mis au point et/ou adapté comporteront en fin de paragraphe une section « discussion » (grisée et en *italique*) dans laquelle je me focaliserai sur les points importants de la technique ainsi que sur les avantages et les potentiels inconvénients de cette méthode. Ainsi, cette section ne représentera pas un « matériels et méthodes » classique, exhaustif, puisque les détails techniques, ainsi que les origines commerciales des produits utilisés sont déjà détaillés dans les sections « matériels et méthodes » des deux articles auxquels j'ai contribué et qui sont intégrés dans la partie « résultats » de ma thèse.

I. Article 1

I.1 Culture cellulaire et transfection

Les lignées cellulaires COS7, COS7 exprimant de façon stable la CgA (COS7-CgA) dérivants d'une tumeur rénale de singe et la lignée cellulaire AtT20 dérivant d'une tumeur hypophysaire corticotrope de souris, sont cultivées dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) complémenté avec 5 % de sérum de veau fœtal (SVF) et 1 % d'un mélange d'antibiotiques (pénicilline (100U/mL) / streptomycine (100 µg/mL)). Le milieu des cellules COS7-CgA est en plus additionné de 300 µg/mL de généticine afin de maintenir la sélection. La lignée cellulaire PC12 dérivant d'un phéochromocytome de rat, est cultivée dans un milieu DMEM complémenté avec 5 % de SVF, 10 % de sérum de cheval (HS), 1 % d'un mélange Pen/Strep et d'1 % de L-Glutamine.

Les cellules sont repiquées en moyenne une fois par semaine. Le jour du passage, le décollement des cellules du support plastique est réalisé *via* l'incubation avec de la trypsine-EDTA. Après ajout de milieu complet afin d'inactiver la trypsine, la suspension cellulaire est centrifugée et le culot est resuspendu dans le milieu complet. Toutes les cultures se font à 37°C sous atmosphère enrichie avec 5 % de CO2.

Les cellules devant être transfectées sont ensemencées la veille dans des plaques de 6 ou 24 puits contenant 2 mL ou 500 µL de milieu sans antibiotiques respectivement, de manière à ce qu'un taux d'environ 70 % de confluence soit atteint le jour de la transfection

(pour les cellules PC12, les lamelles de verres ont été préalablement coatées avec de la poly-L-lysine). Une heure avant la transfection, les cellules sont rincées avec du DMEM puis incubées avec du DMEM contenant 5 % de SVF. Les transfections dans le cadre de cet article, ont été réalisés *via* l'utilisation d'un agent lipofectant (lipofectamine 2000), complexé avec les ADN plasmidiques. Les ADN plasmidiques et la lipofectamine sont dilués séparément dans une solution d'opti-MEM appauvri en sérum comme suit :

- Pour un puits de transfection en P24, 0,8 µg d'ADN est nécessaire, ainsi que 2 µL de lipofectamine dilués séparément dans 50 µL d'opti-MEM.
- Pour un puits de transfection en P6, 4 µg d'ADN est nécessaire, ainsi que 10 µL de lipofectamine dilués séparément dans 250 µL d'opti-MEM.

Suite à un repos de 5 minutes, les 2 tubes sont mélangés précautionneusement et, après une incubation de 20 minutes à température ambiante, la solution contenant les complexes ADN – lipofectamine est ajoutée aux cellules. Les cellules sont incubées 6 heures à 37°C puis le milieu est remplacé par du milieu complet. Les expériences ont été réalisées 48 heures *post*-transfection.

Durant les mises au point des conditions de transfection, j'ai remarqué que le dépôt des complexes ADN – lipofectamine sur des cellules incubées avec du DMEM contenant 5 % de SVF améliorait les rendements de transfection. Par ailleurs, l'ensemencement des cellules en P24 ou P6 dans un milieu dépourvu d'antibiotiques (24 heures avant la transfection) semble diminuer la souffrance cellulaire. Ces conditions de transfection nous permettent d'obtenir des taux de transfection avec nos ADN plasmidiques de l'ordre de 70 % avec les cellules COS7 et AtT20 et de l'ordre de 50 % avec les cellules PC12.

I.2 Mutagénèse dirigée : génération de la CgA dépourvue du domaine d'interaction avec le PA

Le vecteur d'expression pEGFP-N2 a été utilisé pour générer le mutant de la CgA. Il contient la séquence codante complète de la *h*CgA WT, insérée entre les sites de restriction *XhoI* et *SacII* et fusionnée au niveau de l'extrémité C-terminale à l'EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) ainsi qu'à une cassette de résistance à la kanamycine. Ce plasmide CgA – GFP a été utilisé afin d'amplifier la séquence correspondant à la *h*CgA par PCR en utilisant les amorces suivantes :

- 5'-CTCGAGGCCACCATGCGCTCCGCCGCTGTCTCGGCTT-3' (site *XhoI* souligné)
- 5′-CCGCGGGCGCCCCGCCGTAGTGCCTGCA-3′ (site *SacII* souligné)

Puis cette séquence a été clonée dans un vecteur pGEM-T. Le mutant qui a été généré à partir de ce plasmique CgA – pGEM-T est dépourvu de la région de la CgA prédite informatiquement

comme étant capable d'interagir avec le PA (ΔGFRGPGPQLRRGWRPSSR). Le protocole utilisé pour la mutagénèse dirigée est celui du kit QuickChange II site-directed mutagenesis et les amorces utilisées sont les suivantes :

- 5'-CTCTCCTTCCGGGCCCGGGCCTACGAGGACAGCCTTGAGGCGGGCCTG-3' (amorce sens)
- 5'-CAGGCCCGCCTCAAGGCTGTCCTCGTAGGCCCGGGCCCGGAAGGAGAG-3' (amorce anti-sens)

Pour la réaction de PCR, la Pfu Ultra High Fidelity DNA polymérase a été utilisée, et le thermocycleur a été réglé selon la procédure suivante : un cycle d'une minute à 95°C, puis 18 cycles de 40 secondes à 95°C, 50 secondes à 60°C et 5 minutes et 30 secondes à 68°C et 1 cycle de 7 minutes à 68°C.

Les produits d'amplification de la PCR sont ensuite soumis à une digestion enzymatique par DpnI pendant une heure à 37°C afin de digérer spécifiquement les brins d'ADN parentaux méthylés. S'en suit la transformation des bactéries TOP10 *E. Coli* par électroporation. Afin de distinguer les plasmides portant la mutation, les bactéries transformées sont ensuite étalées sur milieu LB (Lysogeny Broth) solide en présence d'ampicilline, (gène de résistance du plasmique d'expression pGEM-T) et incubées une nuit à 37°C. Afin de vérifier que les bactéries ayant poussé contiennent le plasmique mutant, quelques colonies sont prélevées sur chacune des boites de pétri puis l'ADN plasmique est amplifié et purifié à l'aide d'un kit de purification d'ADN plasmidique afin d'être séquencé *via* la méthode de Sanger par la société Genewiz United Kingdom

Suite à la réception des résultats de séquençage, les plasmides CgA – pGEM-T portant la mutation sont digérés successivement 2 heures à 37°C avec les enzymes de restriction *XhoI* et *SacII,* permettant ainsi la récupération du fragment de CgA muté contenu entre ces 2 sites. La totalité du mélange réactionnel est déposé sur gel d'agarose 1,2 % puis la bande correspondant à la CgA mutée est prélevée afin d'en extraire l'ADN *via* le kit Nucleospin Gel and PCR clean up. La quantité d'ADN mutée obtenue est dosée à l'aide du Nanodrop et une étape de ligation est ensuite réalisée afin d'introduire la *h*CgA mutée dans le vecteur pEGFP-N2 à l'aide de l'enzyme T4 ligase.

I.3 Techniques biochimiques

I.3.1 Extraction protéique

Les cellules sont lavées dans du PBS puis incubées sur glace dans un tampon de lyse additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases pendant 1 minute. Après broyage mécanique sur glace, les extraits cellulaires sont centrifugés à 14 000 rpm pendant 10 minutes

à 4°C et les surnageants sont récupérés. Après dosage protéique *via* la méthode de Bradford, du tampon de charge Laemmli est ajouté aux échantillons, qui sont ensuite dénaturés par chauffage à 95°C pendant 5 minutes.

I.3.2 Western-Blot

La séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire est réalisée par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide (4 – 10 %), en condition dénaturantes SDS durant environ 90 minutes à 120 Volts. Le transfert demi-sec des protéines sur membrane PVDF est alors réalisé à l'aide du Trans-blot Turbo. Un courant de 2,5A est appliqué pendant 10 minutes et permet aux protéines de migrer depuis le gel vers la membrane de PVDF, tout en conservant leur organisation relative. Après saturation des sites non spécifiques des protéines avec une solution de blocage contenant du PBS, 5 % de lait et 0,1 % de Tween-20, les membranes sont incubées avec les anticorps primaires dirigés contre les protéines d'intérêt durant la nuit à 4°C. Après 3 lavages de 15 minutes avec une solution de PBS contenant 0,1 % de Tween-20, les membranes sont incubées avec les anticorps secondaires couplés à la HRP (peroxydase de raifort) durant 1 heure à température ambiante. Après rinçage, les protéines cibles sont révélées par chimiluminescence en apportant le substrat de la HRP. Le signal est détecté et enregistré *via* le système « ChemiDoc XRS » de Bio-Rad.

I.3.3 Test de liaison entre la CgA et les phospholipides membranaires

Les *lipids strips* sont des membranes de nitrocellulose sur lesquelles sont adsorbés différents lipides membranaires (100 pmol par spot), produites et commercialisées par Echelon Biosciences. Nous avons utilisé cette approche facile à mettre en œuvre pour déterminer si la CgA pouvait interagir avec un ou plusieurs lipides membranaires. Tout d'abord, les membranes ont été incubées dans un tampon de saturation constitué de PBS-T (0,1 % v/v Tween 20 dans du PBS) et de 3 % BSA sans acides gras pendant 1 heure à température ambiante. Ensuite, les membranes saturées ont été incubées avec 500 ng/mL de CgA humaine recombinante purifiée diluée dans le tampon de saturation pendant une heure à température ambiante. S'en suivent trois lavages de 15 minutes avec du PBS-T afin d'éliminer l'excès de CgA, puis les membranes sont incubées avec un anticorps anti-WE-14 produit au sein du laboratoire et spécifique de la CgA (Montero-Hadjadje et al., 2002) dilué dans le tampon de saturation, pendant 1 heure à température ambiante. Après 3 lavages de 15 minutes avec du PBS-T, les membranes ont été incubées avec un anticorps secondaire couplé à la HRP et visualisées par chimioluminescence *via* le système « ChemiDoc XRS ». Une

analyse densitométrique a été effectuée pour déterminer l'affinité relative de la liaison de CgA aux divers phospholipides.

Ce test décrit en 2002 par Dowler et collaborateurs (Dowler et al., 2002)*, consiste en l'immobilisation de plusieurs lipides sur une membrane de nitrocellulose. Cette membrane est ensuite incubée avec la protéine d'intérêt, lavée puis la liaison protéine-lipide est détectée par l'addition séquentielle d'un anticorps dirigé contre la protéine et d'un anticorps secondaire chimioluminescent. Cette méthode réalisable en une journée nécessite de très faibles concentrations de protéines (500 ng/mL lors de nos expériences) et de lipides (100 pmol de lipides par spot). Depuis, cette approche est couramment utilisée dans la littérature afin de déterminer, de façon préliminaire, si une protéine donnée, peut engager des forces électrostatiques avec un lipide membranaire, et ainsi, interagir avec ce lipide* (Tang et al., 2017)*. Néanmoins, avec ce test, il ne faut pas oublier de considérer que les spots lipidiques sont constitués de lipides « désordonnés », non organisés en bicouche lipidique, alors qu'in cellulo, les lipides membranaires sont toujours organisés sous forme de bicouche lipidique. Par ailleurs, il faut également prendre en compte qu'au sein des membranes biologiques, les lipides ne sont pas isolés et la présence des autres lipides membranaires peut impacter le comportement du lipide en question, influençant alors les liaisons lipides-protéines. Par ailleurs, il est connu que les variations de pH ainsi que les concentrations calciques environnantes peuvent avoir un impact sur les liaisons lipides-protéines, paramètres qui ne sont pas pris en compte lors de ce test. Ainsi, il est recommandé d'utiliser en parallèle d'autres méthodes permettant de mimer le comportement des lipides d'intérêt au sein de membranes organisées en bicouche se rapprochant de la composition de celle de l'organite d'intérêt afin de valider l'interaction lipides-protéine* (Narayan and Lemmon, 2006; Saliba et al., 2015)*. De ce fait, les résultats obtenus doivent être confirmés et validés en incubant par exemple la protéine avec des liposomes enrichis avec le lipide d'intérêt, puis d'utiliser des méthodes qui permettent de mesurer l'interaction entre les deux partenaires, telle que le titrage calorimétrique isotherme.*

I.4 Préparation des liposomes géants (Giant Unilamelar Vesicles ou GUV) et couplage de la CgA à l'Alexa 488

Les GUVs ont été préparés en utilisant la méthode « PVA (alcool polyvinylique) – assisted swelling » (**Figure n°38)**.

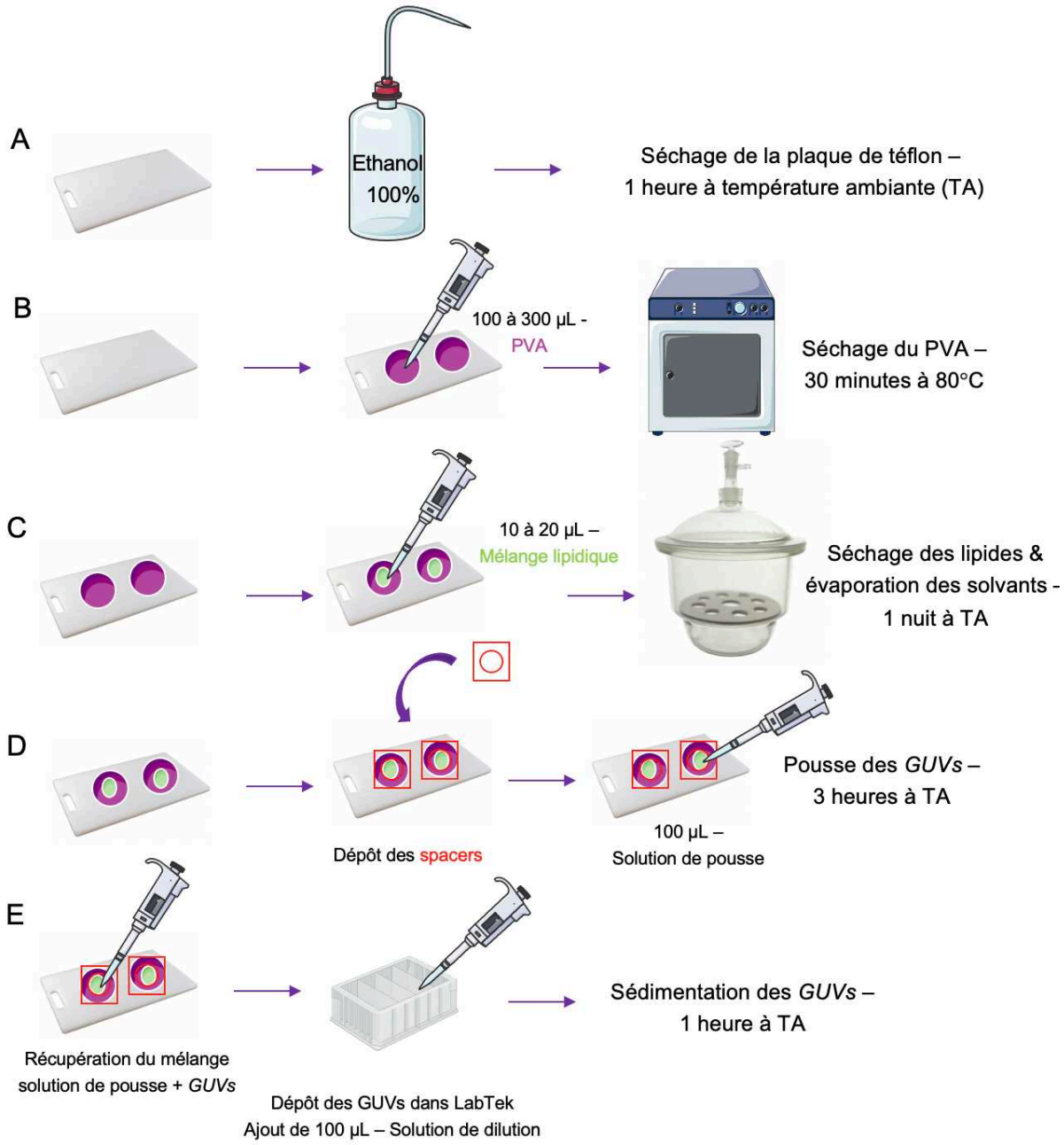


Figure n°38. Protocole utilisé pour la formation des Giant Unilamellar Vesicles (GUVs). *(A)* Préparation de la plaque de téflon. *(B)* Dépôt de la solution de PVA et séchage. *(C)* Dépôt des mélanges lipidiques préalablement préparés et évaporation des solvants. *(D)* Dépôt des spacers et de la solution de pousse. *(E)* Récupération des GUVs suite à la pousse, dépôt de la solution de dilution et sédimentation des GUVs.

Premièrement, une plaque de Téflon est rincée deux fois avec de l'éthanol à 100 % et une solution de PVA à 5 % est préparée en diluant du PVA dans de l'eau tout en chauffant à 90°C. Ensuite, 100 à 300 µL de la solution de PVA sont étalés sur la plaque de Téflon propre et sèche puis le PVA est cuit pendant 30 minutes à 80°C. Environ 10 à 20 µL d'un mélange lipidique (95 % de DOPC, 4 % de PA (36 : 1) ou (40 : 6) et 1 % de PE-NBD) dissous dans du chloroforme (1 mg/mL) est déposé sur le film de PVA séché, puis placé sous vide pendant une nuit à température ambiante afin d'évaporer le solvant. Le lendemain, une chambre est formée

autour des gouttes de lipides en utilisant un joint épais en caoutchouc (spacer) et cette chambre est remplie avec 100 µL d'une solution de pousse à 100 mM de saccharose et 150 mM de NaCl. La formation des GUVs s'effectue durant 3 heures à température ambiante. Ensuite, la solution contenant les GUVs est récupérée à l'aide d'un cône à embout large pour éviter la destruction des GUVs, puis déposée dans des puits de LabTek (lame pourvue de 4 chambres de culture) préalablement coatés avec une solution à 1 mg/mL de BSA. Pour permettre la sédimentation des GUV, nous avons ajouté le même volume (100 µL) d'une solution de dilution contenant 90 mM de glucose et 15 mM de NaCl dans chacun des puits. La sédimentation des GUVs a lieu pendant environ 1 heure à température ambiante.

Pour tester l'effet de la CgA sur les membranes des GUV, nous avons ajouté de la CgA recombinante non fluorescente ou de la CgA couplée au fluorophore Alexa 488 dans les puits contenant les GUVs, à une concentration finale de 2, 4 ou 6 µM, juste avant le début des acquisitions en microscopie confocale.

Le couplage de la CgA avec l'Alexa 488 a été envisagé afin de pouvoir suivre la fixation et/ou l'incorporation de la CgA au niveau de la membrane des GUVs lors des observations en microscopie. Ce couplage a été réalisé en collaboration avec les chimistes du laboratoire COBRA, et, durant ma thèse, j'ai pu suivre et participer à ce couplage **(Figure n°39)**.

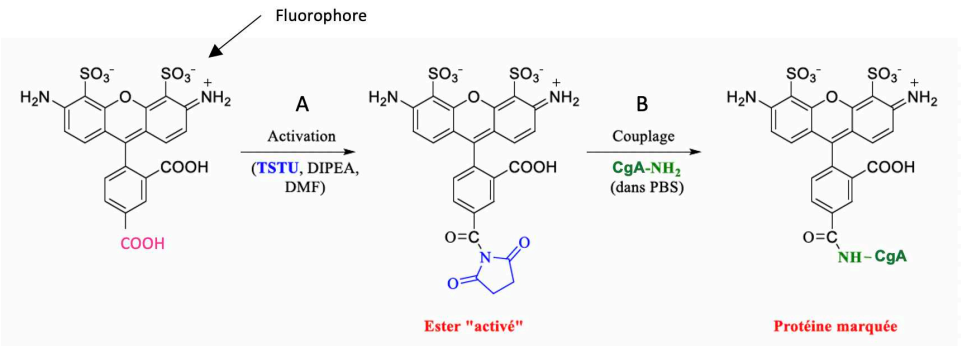


Figure n°39. Etapes du couplage de la CgA avec l'Alexa 488. *(A)* Activation de la fonction carboxylique portée par le fluorophore *via* le TSTU, permettant ainsi d'obtenir un ester activé. *(B)* Couplage du « fluorochrome activé » avec la CgA grâce à la réaction entre le TSTU et les fonctions amines portées par les lysines de la CgA.

Le choix du fluorophore s'est porté sur l'Alexa 488 puisqu'il est commercialisé, soluble dans l'eau et couramment utilisé en microscopie confocale. Afin de coupler fluorophore et protéine, il est nécessaire dans un premier temps d'activer la fonction acide carboxylique (COOH) portée par le fluorophore *via* un ester activé puis de réaliser le couplage avec les fonctions amines (NH_2) libres de la protéine. Pour cela, dans un premier temps, l'Alexa 488 sous forme de poudre est repris dans un mélange DMF (N,N-Dimethylformamide), solvant nous permettant de réaliser ce couplage dans de bonnes conditions réactionnelles, et DIPEA

(N,N-Diisopropylethylamine), une base ayant la capacité d'enlever un proton au niveau du groupement carboxylique libre du fluorophore. L'élimination de ce proton permet à l'agent de couplage, le TSTU (2-Succinimido-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate), de se fixer au niveau du fluorophore (formation d'un ester activé) et de réaliser le couplage entre l'Alexa 488 et les amines libres portées par les lysines de la CgA.

La méthode de formation des GUVs par gonflement assisté par gel est rapide, permet la formation des GUVs dans des tampons contenant des concentrations physiologiques de sel et ne nécessite pas d'équipement spécialisé. Le premier gel utilisé pour assister la formation des GUVs était l'agarose. Cependant, il s'est avéré que les propriétés mécaniques globales des GUVs en présence d'agarose étaient différentes par rapport aux GUVs sans agarose (Lira et al., 2014). En effet, l'agarose se dissout à température ambiante lors de la formation des GUVs et ainsi, entraîne la contamination de la membrane des GUVs. Toutefois, cette ancienne méthode avait l'avantage de permettre de préparer facilement et rapidement des GUVs sans avoir besoin d'équipement spécifique et pouvant posséder une large gamme de compositions lipidiques (Jørgensen et al., 2017). Ainsi, lors de nos travaux, nous avons utilisé une méthode inspirée de celle-ci, avec des gels d'alcool polyvinylique (PVA) en lieu et place de l'agarose (Weinberger et al., 2013). Les travaux de cette équipe ont montré que les gels PVA optimisent la distribution des lipides à l'interface entre le substrat et le tampon hydratant. Par ailleurs, les gels PVA sont beaucoup moins sujets à la dissolution lors du gonflement à température ambiante que les autres gels hydrophiles physiques, et ainsi, les GUVs formés par la méthode de gonflement assisté par le PVA ne sont pas contaminés par le polymère (Weinberger et al., 2013). Cette méthode est par ailleurs tout à fait adaptée à l'étude de l'interaction entre les lipides et les protéines (Jørgensen et al., 2017).

Ainsi, ces différents avantages ont guidé notre choix vers cette méthode de formation des GUVs pour nos travaux. Malgré tout, le principal inconvénient subsistant de cette technique est la formation de GUVs de diamètre hétérogène (entre 10 et 100 µm). Dans nos conditions expérimentales, cet inconvénient est malgré tout en partie compensé par le fait qu'avec la microscopie confocale, nous pouvons choisir et nous focaliser sur des GUVs ayant un diamètre similaire (environ 30 µm) afin de réaliser nos acquisitions. Il existe cependant d'autres méthodes de formation des GUVs, pouvant produire des GUVs ayant un diamètre similaire. C'est notamment le cas de la méthode d'électro-gonflement développée par Angelova et Dimitrov (Angelova and Dimitrov, 1986), basée sur les effets combinés de l'auto-organisation lipidique en solution aqueuse et de l'électro-osmose. Dans cette méthode, un film lipidique est déposé sur une surface conductrice homogène. Après évaporation du solvant, une solution aqueuse est ajoutée puis un champ électrique est appliqué. Cette procédure permet de produire des GUVs de diamètre compris entre 5 à 150 µm (Diguet et al., 2009). Une

adaptation de cette technique d'éléctro-gonflement permet d'obtenir des GUVs de taille identique, grâce au remplacement de l'électrode plate par un substrat de silicium micro-structuré qui permet un dépôt contrôlé de lipides uniquement dans des trous de diamètre et de profondeur définis (Diguet et al., 2009). Le diamètre final des GUVs peut être ajusté en variant le diamètre du trou. Avec cette stratégie, les GUVs produits mesurent entre 5-20 µm ou 10-30 µm de diamètre. Malgré tout, cette technique nécessite l'utilisation d'un équipement spécifique et il semblerait que les solvants dans lesquels sont dilués les lipides, et qui ne sont pas évaporés avec cette méthode, interfèrent lors des études lipides – protéines, en dénaturant les protéines amphiphiles (Jørgensen et al., 2017). Par ailleurs, des études récentes ont également montré qu'avec cette méthode, il est très compliqué de former des GUVs contenant une forte proportion de lipides chargés, et le PA, représentant au minimum 4 % de notre mélange lipidique, est un lipide portant 1 ou 2 charges négatives, selon le pH environnant (Breton et al., 2015). Par ailleurs, l'application d'un courant électrique peut entraîner l'oxydation des lipides insaturés (Breton et al., 2015).

I.5 Immunocytochimie

Les immunomarquages dans cet article ont été réalisés exclusivement sur cellules. Nous avons utilisé cette technique afin de déterminer la localisation subcellulaire de nos protéines d'intérêt. Ainsi, 48 heures *post*-transfection ou 6 heures après traitement avec 75 nM de FIPI (5-Fluoro-2-indolyl des-chlorohalopemide), un inhibiteur de la PLD, les cellules sont rincées deux fois avec du PBS puis fixées avec du PBS contenant 4 % de paraformaldéhyde (PFA) durant 15 minutes à température ambiante. Afin de pouvoir réaliser les marquages intracellulaires et réduire le marquage dû à une liaison non spécifique des anticorps, les cellules sont incubées avec un tampon de perméabilisation/saturation contenant du NDS (Normal Donkey Serum) au 1/20ème, de la BSA à 0,3 % et du Triton X-100 à 1 %, dilué dans du PBS, pendant 25 minutes à température ambiante. Après 3 lavages de 5 minutes dans du PBS, les cellules sont incubées une nuit à 4°C avec les différents anticorps primaires. Après 3 lavages de 5 minutes avec du PBS, les cellules sont incubées avec les anticorps secondaires couplés aux fluorochromes (Donkey anti-Rabbit/Mouse/Goat couplés à l'Alexa 488 ou 594) durant 1 heure à température ambiante et à l'obscurité. Les lamelles de verres sont ensuite de nouveau rincées 3 fois durant 5 minutes puis le noyau est marqué à l'aide du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) dilué au 1/5000 dans du PBS durant 30 secondes à température ambiante, toujours à l'obscurité. Pour terminer, les lamelles sont rincées 3 fois durant 5 minutes avec du PBS puis rincées rapidement à l'eau et montées sur lames en utilisant un milieu de montage adapté à l'observation en microscopie à fluorescence, le Mowiol.

I.6 Techniques de microscopie

I.6.1 Microscopie confocale SP8

Les lames provenant des expériences d'immunocytochimie ont été observées avec un microscope confocal droit à balayage laser (Leica TCS SP8), mis à disposition sur la plate-forme d'imagerie cellulaire PRIMACEN.
Ce microscope confocal est équipé d'objectifs à immersion à huile (40X, 63X), ainsi que de divers lasers permettant d'exciter les fluorochromes, couplés aux anticorps secondaires, ou les protéines fluorescentes telles que la GFP, et d'un laser UV pour exciter le DAPI. L'Alexa 594 est excité à 594 nm et observé dans une fenêtre de longueurs d'onde située entre 600 et 630 nm ; l'Alexa 488 ainsi que la GFP sont excitées à 488 nm et observées dans une fenêtre de longueurs d'onde située entre 505 et 540 nm. Pour les acquisitions multicanaux, les images ont été acquises séquentiellement en mode de balayage linéaire (ligne moyenne = 2) puis la superposition des canaux a été effectuée avec la fonction *post*-acquisition du logiciel d'acquisition Leica LAS X. Afin de pouvoir comparer différentes conditions, toutes les images ont été acquises avec les mêmes paramètres.

Ce microscope confocal possède 4 détecteurs (2 Hybrides + 2 PMT), ce qui en fait un système très polyvalent et parfaitement adapté pour les questions nécessitant une imagerie simultanée de plusieurs fluorophores avec une cadence d'acquisition relativement rapide. Par ailleurs, ce type de configuration permet une imagerie multi-couleurs simultanée en super-résolution jusqu'à 120 nm (en utilisant l'objectif 63x), et possède le grand avantage d'être plutôt respectueux envers les échantillons grâce à une faible phototoxicité.

I.6.2 Microscopie confocale SP5

L'impact de l'interaction entre la CgA et le PA sur la dynamique membranaire étudié *via* les GUVs a été observé et enregistré à l'aide du microscope confocal inversé (Leica TCS SP5 AOBS), également mis à disposition sur la plate-forme PRIMACEN. Ce microscope confocal est équipe d'objectifs à immersion à huile (40X, 63X) ainsi que d'un laser à lumière blanche (WLL) pouvant exciter toutes les longueurs d'ondes. La GFP est excitée à 488 nm et observée dans une fenêtre de longueurs d'onde située entre 505 et 540 nm. Le NBD (nitrobenzoxadiazole) couplé avec la PE (phosphatidyléthanolamine) est excité à 463 nm et observé dans une fenêtre de longueurs d'onde entre 510 et 550 nm. Pour les besoins de l'expérience, des séries temporelles en « xyt » ont été acquises durant 1 minute suite à l'ajout de la CgA recombinante ou de la CgA – Alexa488 sur les GUVs. Durant l'acquisition, une

image a été prise toutes les deux secondes. Afin de pouvoir comparer les conditions entre elles, toutes les acquisitions temporelles ont été acquises selon les mêmes paramètres.

Ce système confocal a l'avantage de couvrir une large gamme de vitesses d'imagerie, de l'enregistrement ponctuel à l'imagerie en temps réel. Ce système est donc adapté à nos conditions expérimentales en combinant la précision d'un confocal (résolution latérale de 180 nm en utilisant l'objectif 63x) avec l'imagerie time-lapse sur des temps courts.

I.7 Analyse post-acquisition *via* Imaris

L'analyse des images a été réalisée à l'aide du logiciel Imaris afin de quantifier le nombre de granules contenant la CgA dans les cellules, dans deux types d'expériences :

- Transfection des cellules COS7 ou AtT20 avec les construits CgA-GFP ou CgAΔPABD-GFP (mutant de la CgA dépourvu de la région liant le PA) afin de quantifier l'implication de cette région dans la formation des GSCD.
- Traitement des cellules COS7 exprimant de façon stable la CgA ou des cellules PC12 avec le FIPI puis quantification de l'impact de cet inhibiteur de la PLD sur la formation des GSCD.

Les images acquises avec le microscope confocal Leica TCS SP8 (fichier .lif) ont été ouvertes à l'aide du logiciel Imaris. Ensuite, une région d'intérêt (ROI) a été définie autour de chaque cellule, sachant que pour chaque expérience, les expérimentations ont au moins été répétées 3 fois et qu'au moins 70 cellules ont été analysées par condition.
Puis avec l'outil « spot detection », les vésicules ayant un diamètre supérieur ou égal à 200 nm ont été quantifiées, au sein de chaque ROI. Cet outil est ainsi parfaitement adapté à la détection de structures sous forme de sphères 3D au sein de chaque ROI, permettant un repérage facile, et la rectification manuelle des erreurs de détection lorsque cela est nécessaire. Les fichiers contenant les données générées par Imaris sont ensuite exportés sous la forme d'un fichier excel puis analysés statistiquement avec le logiciel GraphPad Prism 6.04 *via* le test non-paramétrique de Mann-Whitney.

Le logiciel Imaris est capable de traiter des séquences d'images acquises en z avec une grande facilité. Il permet de quantifier le nombre de GSCD comme expliqué ci-dessus, mais il est également capable, lorsque nous travaillons avec des stacks d'images, de quantifier le volume d'un organite (comme celui de l'appareil de Golgi via le marqueur GM130). Ce logiciel permet une automatisation des quantifications mais propose également des fonctions dans lesquelles l'expérimentateur peut intervenir afin d'affiner la détection des objets.

II. Article 2 (en préparation)

II.1 Culture primaire de cellules chromaffines bovines

Les cellules chromaffines bovines sont obtenues après digestion de la médullosurrénale avec un mélange de collagénase P de *Clostridium histolyticum* et de trypsine, puis sont purifiées par culture différentielle (Ait-Ali et al., 2008; Anouar et al., 1994). Les cellules chromaffines primaires sont isolées à partir des glandes surrénales de bovins âgés de 6 à 24 mois, récupérées auprès d'un abattoir local (selon l'autorisation n°1069/2009 DDPP76/SPAE). Après avoir retiré la graisse environnante et le tissu conjonctif de ces glandes, elles sont rincées à l'éthanol 75% puis placées dans du DMEM froid additionné d'un mélange d'antibiotique et d'anti-mycosique (Anti-Anti). La veine surrénale est d'abord perfusée avec environ 30 mL d'une solution d'HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) afin d'éliminer le sang du réseau vasculaire. Puis, chaque glande est digérée par une solution enzymatique contenant de la Collagénase P, de la Dnase et de la trypsine (0,75mg/0,62mg/22,5U par ml respectivement), pendant 30 minutes à 37°C, sous agitation, avant d'être disséquée afin de séparer les parties corticale et médullaire. S'en suit une dissociation mécanique de la médullosurrénale *via* des aspirations/refoulements et une nouvelle incubation des fragments de la médullosurrénale avec la solution enzymatique est réalisée 10 minutes à 37°C sous agitation. Une nouvelle dissociation est réalisée par filtration sur un tamis présentant des mailles de 1 mm de diamètre, suivie de l'élimination de la solution enzymatique par centrifugation durant 8 minutes à 500 g. Le culot cellulaire obtenu est repris dans du DMEM contenant 1 % d'Anti-Anti et filtré sur un tamis constitué de mailles de 217 µm de diamètre puis sur un filtre de 100 µm afin d'éliminer les agrégats cellulaires. L'élimination des hématies restantes est permise par leur éclatement hypotonique avec de l'eau froide pendant 10 secondes, suivie de l'ajout immédiat de 30 mL de DMEM additionné de 1 % d'Anti-Anti à 37°C, avant que la suspension cellulaire soit à nouveau centrifugée, pendant 5 minutes, à 500 g. Après élimination du surnageant, les cellules chromaffines sont reprises dans du milieu DMEM complet (contenant 5% de SVF, 2.5% de HS, 4mM de L-glutamine et 100 µg/mL de Primocine, qui est un agent antimicrobien/antifongique couramment utilisé pour les cellules primaires) puis réparties dans des flacons T75 et incubées au minimum 1h dans l'incubateur (37°C, 5% de CO2). Cet ensemencement durant 1 heure permet la séparation des cellules chromaffines des autres cellules présentes dans le tissu médullaire telles que les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules corticales. En effet, ces différents types cellulaires ont des vitesses d'adhésion sur le plastique qui sont différentes et il a été mis en évidence que les cellules « non-chromaffines » adhérent beaucoup plus rapidement que les cellules chromaffines (Anouar et al., 1994; Waymire et al., 1983). Lorsque l'incubation est terminée, la fraction

correspondant aux cellules chromaffines est récupérée puis centrifugée, le culot est repris dans 10 mL de DMEM complet et les cellules sont comptées à l'aide d'une cellule de Neubauer. Les cellules chromaffines sont ensuite ensemencées à raison de 100 000 cellules par puits dans des plaques de 24 puits contenant des lamelles en verre préalablement coatées avec un mélange de poly-L-Lysine (20 µg/mL, 1h) et de collagène I (200 µg/mL, overnight) pour les études de couplage exocytose-endocytose et à raison de 250 000 cellules par puits dans des plaques de 12 puits préalablement coatés avec de la poly-L-lysine (20 µg/mL, 1h) pour les études de sécrétion. Les cultures sont maintenues 24h dans un incubateur à 37°C en présence de 5 % de CO2 puis le milieu est renouvelé avec du DMEM complet additionné d'un mélange d'antimitotiques (10 µM de cytosine arabinoside et 10 µM de 5-fluoro-cytarabine). Les expériences ont lieu entre 3 et 6 jours après l'ensemencement des cellules chromaffines afin de permettre aux cellules d'adhérer correctement au substrat. Cependant, il est important de noter qu'après 6 à 7 jours de culture, une variété de facteurs peuvent entraver le bon fonctionnement de ces cellules, tels que les infections microbiennes (malgré les antibiotiques), la toxicité des antimitotiques, la prolifération de cellules non chromaffines dans la culture (malgré les antimitotiques) ou l'épuisement des nutriments dans le milieu.

Les cellules chromaffines bovines sont un modèle de choix pour l'étude de la sécrétion neuroendocrine, et l'utilisation de ces cellules présente également plusieurs avantages techniques. En effet, elles sont facilement dissociables de la partie corticosurrénalienne et il est possible d'en recueillir un nombre considérable : 100 millions de cellules peuvent être obtenues à partir d'une douzaine de glandes. Ceci permet donc de faire des expériences de biochimie nécessitant un nombre important de cellules, ainsi que des études immunocytochimiques et des observations sur cellules vivantes puisqu'elles peuvent être aussi bien ensemencées sur du plastique que sur du verre, lorsque le coating est adapté.
Notre méthode de préparation des cellules chromaffines est adaptée de plusieurs protocoles existants et validés dans la littérature (Anouar et al., 1994; O'Connor et al., 2007). Néanmoins, même si la digestion des cellules de la médullosurrénale par la collagénase P est admise, nous avons fait le choix de diminuer légèrement sa concentration, et de compléter son action par celle de la trypsine, une enzyme plus économique et accessible que la collagénase P. Nous avons remarqué que la dissociation des cellules chromaffines aboutit à un rendement très satisfaisant tout en nous permettant d'économiser la collagénase P. À ce mélange d'enzymes, nous ajoutons de la DNAse I afin d'éviter que l'ADN génomique libéré par les cellules mortes ne forme des agrégats piégeant les cellules.

Concernant l'élimination des autres types cellulaires (fibroblastes, cellules corticosurrénaliennes) de la préparation de cellules chromaffines, nous avons fait le choix d'utiliser la technique de culture différentielle, dans laquelle les « cellules non-chromaffines »

sont éliminées grâce à leurs capacités à adhérer plus rapidement sur un substrat en plastique. Cette technique est validée dans la littérature et a fait ses preuves lors de cultures réalisées il y a quelques années au sein de notre laboratoire (Ait-Ali et al., 2008; Anouar et al., 1994; Waymire et al., 1983). Par ailleurs, nous incluons dans le milieu de culture des antimitotiques dans le but de limiter la croissance des types cellulaires « non-chromaffines ». L'élimination des globules rouges est quant à elle réalisée via une incubation durant 10 secondes du culot cellulaire avec de l'eau froide, afin de permettre leur éclatement hypotonique, puis l'action de l'eau est inhibée grâce à l'ajout en fort excédent de DMEM chaud suivi d'une centrifugation. Cette technique, qui nous semblait « radicale » lors des mises au point, se révèle très efficace sans pour autant affecter la survie des cellules chromaffines (la viabilité est de l'ordre de 90 %), et remplace la technique plus lourde de purification par gradient de Percoll. Par ailleurs, d'autres laboratoires spécialisés dans la culture de cellules chromaffines outrepassent cette étape de gradient de Percoll en répétant plusieurs étapes de centrifugation douces (au moins 4) durant lesquelles les cellules chromaffines sont culottées au fond du tube et ainsi, les débris cellulaires et les globules rouges peuvent être retirés délicatement sur le côté du tube et sur le haut du culot respectivement (O'Connor et al., 2007).Cependant, cette technique est plus délicate à mettre en œuvre que la technique de culture différentielle complétée par l'éclatement hypotonique des globules rouges. Il est également connu qu'un trop grand nombre de centrifugations peut entraîner une lyse des cellules, et nous avons voulu nous affranchir de ce phénomène. Par ailleurs, il semblerait que le rendement de cellules chromaffines obtenu avec cette méthode soit moindre, puisque l'élimination des contaminants se réalise « à l'œil », avec l'extrémité du cône d'une pipette.

II.2 Techniques biochimiques

II.2.1 Stimulation des cellules et suivi de l'externalisation de la CgA par immunocytochimie couplée à la microscopie confocale

Les cellules chromaffines ont été préalablement ensemencées dans 2 plaques P24 contenant des lamelles de verres coatées (voir paragraphe ci-dessus). Ces 2 plaques sont réalisées en parallèle et sont organisées comme suit : **Plaque P1** permettant de visualiser l'externalisation de la CgA suite à la stimulation des cellules, **plaque P2** contrôle, permettant de vérifier l'efficacité de stimulation et la spécificité des anticorps **(Figure n°40)**.

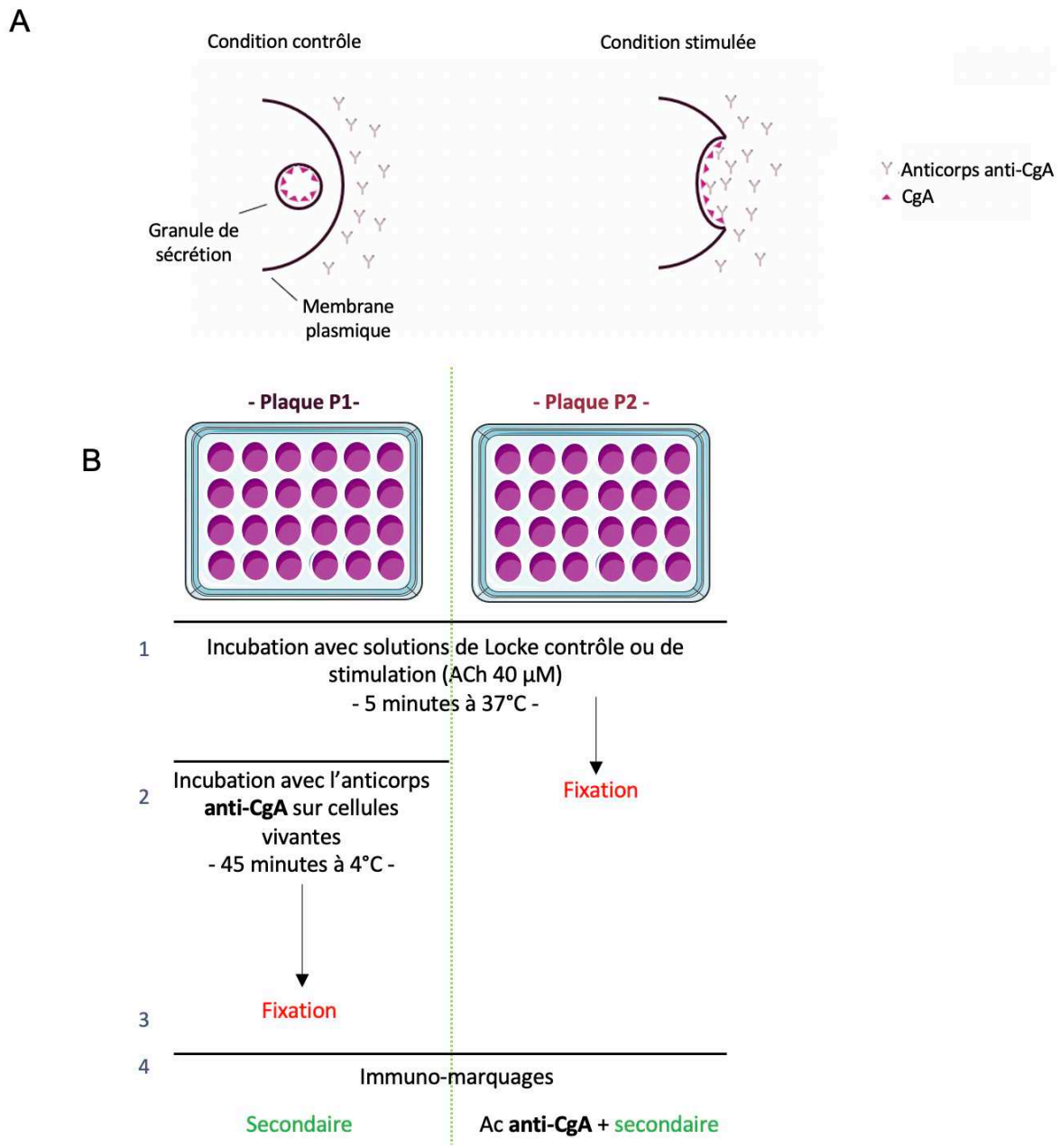


Figure n°40. Protocole utilisé pour le suivi de l'externalisation de la CgA par immunocytochimie. *(A)* Représentation schématique du test permettant de suivre la présence de la CgA au niveau de la membrane plasmique dans les cellules chromaffines. L'exocytose et la fusion du GSCD avec la membrane plasmique donnent accès à la lumière des GSCD. Ainsi, la CgA associée à la membrane des GSCD devient accessible aux anticorps anti-CgA présents dans le milieu extracellulaire suite à une incubation réalisée à 4°C.
(B) Schéma récapitulant les grandes étapes du protocole. *(1)* Les deux plaques P1 et P2 sont incubées avec la solution de Locke contrôle ou contenant 40 µM d'ACh. *(2)* La plaque P1 est incubée avec l'anticorps anti-CgA sur cellules vivantes afin de marquer les spots exocytiques tandis que la plaque P2, contrôle est fixée. *(3)* La plaque P1 est fixée. *(4)* Les 2 plaques subissent ensuite un protocole classique d'immuno-marquage.

Les cellules chromaffines des plaques P1 et P2 et sont rincées deux fois avec une solution de Locke (140 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM $CaCl_2$, 1.2 mM KH_2PO_4, 1.2 mM $MgSO_4$, 11 mM glucose et 15 mM HEPES, pH 7.4) puis incubées pendant 5 minutes à 37°C dans la

solution de Locke (condition contrôle) ou avec la solution de Locke contenant 40 µM d'acétylcholine (condition stimulée, ACh). Après un rinçage avec la solution de Locke, les cellules de la plaque P1 sont incubées pendant 45 minutes à 4°C avec l'anticorps dirigé contre la CgA dilué au 200ème dans une solution de Locke contenant 0,2 % de BSA fatty acid free tandis que les cellules de la plaque P2 sont fixées avec du PFA 4 % durant 15 minutes sur glace puis rincées 2 fois durant 5 minutes avec du PBS. Suite à l'incubation avec l'anticorps primaire, les cellules de la plaque P1 sont rincées avec la solution de Locke froide puis sont fixées selon le même protocole utilisé pour la plaque P2.
Les cellules des 2 plaques sont ensuite incubées avec la solution de saturation et/ou de perméabilisation (décrites ci-dessus) si un marquage intracellulaire doit être réalisé, pendant 25 minutes à température ambiante. Enfin, les cellules subissent le même protocole que celui utilisé pour les études d'immunocytochimie réalisées dans l'article 1.

II.2.2 Stimulation des cellules et suivi de l'externalisation de la CgA par western blot

Le protocole décrit ci-dessous résulte de l'adaptation à nos conditions expérimentales de la technique originale développée par l'équipe de S. Chasserot-Golaz (Gabel et al., 2020). Des flacons de culture T75 contenant 10 millions de cellules chromaffines sont soumis à 3 lavages par du Locke « normal » (Locke N) (140 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM KH_2PO_4, 1,2 mM $MgSO_4$, 11 mM glucose, 0,56 mM acide ascorbique, 0,01 mM éthylènediaminetétraacétique (EDTA), 2,5 mM $CaCl_2$ et 15 mM HEPES, pH 7,4) pendant 10 minutes, puis avec du Locke EGTA (140 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM KH_2PO_4, 1,2 mM $MgSO_4$, 11 mM glucose, 0,56 mM acide ascorbique, 1 mM éthylèneglycoltétraacétique. (EGTA) et HEPES 15 mM, pH 7,4) afin de décrocher les protéines aspécifiques liées à la membrane.

Les cellules sont ensuite incubées 10 minutes avec du Locke N pour la condition repos ou stimulées avec une solution d'ACh 40 µM puis les sécrétats sont récupérés. Les cellules sont ensuite incubées avec du Locke EGTA pendant 10 minutes et les fractions éluats EGTA sont récupérées. Les cellules sont quant à elle lysées sur glace avec 2 mL de tampon de lyse contenant des inhibiteurs de protéases, centrifugées (15 minutes à 20 000g) puis les surnageants sont récupérés et les protéines dosées *via* le dosage de Bradford. Les sécrétats et éluats EGTA sont précipités et concentrés en utilisant de l'acide trichloroacétique (TCA) à 10 %. Ensuite, les contenus cellulaires, les sécrétats et les éluats EGTA ont été séparés par SDS-PAGE suivi d'un transfert sur membrane de PVDF (western blot détaillé dans la section I.3.b).

II.2.3 Étude de la sécrétion de CgA suite au traitement des cellules par le FIPI

Des plaques de 6 puits contenant 2,5 millions de cellules chromaffines par puit sont lavées 2 fois dans du Locke N pendant 10 minutes, puis incubées pendant 1 heure à 37°C avec 100 nM de FIPI (5-Fluoro-2-indolyl des-chlorohalopemide, inhibiteur des phospholipases D1 & D2) dilué dans du Locke N ou du Locke N seul pour la condition contrôle. Les cellules sont ensuite incubées 10 minutes avec du Locke N pour la condition repos ou stimulées avec une solution d'ACh 40 µM puis les sécrétats sont récupérés. La lyse des cellules, le dosage des protéines des contenus cellulaires, la concentration des protéines des sécrétats *via* le TCA et le western blot ont été réalisés de la même façon que celle décrite dans la section II.2.c).

II.2.4 Étude de la sécrétion des CAs suite au traitement des cellules par le FIPI

Trois jours après l'ensemencement, les cellules chromaffines bovines sont lavées et incubées avec du milieu Krebs (125 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,2 mM NaH_2PO_4, 1,2 mM $MgSO_4$, 10 mM HEPES, 2 mM $CaCl_2$, 26 mM $NaHCO_3$, 2,8 mM Glucose et 0,1% de BSA), en présence ou non de 100 nM FIPI, durant 1h à 37°C. Lorsque cette période de pré-incubation est terminée, les cellules sont incubées, toujours à 37°C, pendant une première période (période P1) de 15 minutes avec 325 µL de milieu Krebs (condition contrôle) en absence ou présence de 100 nM de FIPI.
Dans un second temps (période P2), les cellules sont incubées pendant 15 minutes à 37°C avec 325 µL de milieu Krebs (condition contrôle) et en absence ou présence de 20 µM d'ACh. Après chaque période d'incubation P1 et P2, le milieu de chacun des puits est collecté, puis centrifugé à 100 g pendant 5 minutes, et les surnageants sont stockés à -20°C **(Figure n°41)**.

La mesure de la libération des catécholamines (CAs) est réalisée sur plaque par détection fluorimétrique après dérivatisation de la benzylamine en présence des catécholamines. Pour réaliser le dosage, une gamme étalon est générée à partir d'une solution mère d'adrénaline (1mM), diluée en série pour des concentrations allant de 0.05 à 100 µM dans l'HBSS. Des aliquots de 100 µL sont réalisés à partir de la gamme étalon et des tubes contenant les surnageants des plaques P1 et P2, puis 200 µL d'une solution contenant l'agent de dérivatisation (20 µl de benzylamine hydrochloride à 0.4 M dans 90 % de méthanol ; 10 µl de 3-cyclohexylaminopropanesulfonique acide à 0.1 M et pH = 11 et 10 µl de potassium hexacyanoferrate III à 10 mM dans 50 % de méthanol) sont ajoutés aux tubes. La procédure de dérivatisation est réalisée *via* le chauffage des tubes à 50°C pendant 30 minutes au sein

d'un bain à sec. Suite au refroidissement des tubes sur glace, une fraction de 200 µL provenant de chacun des tubes est transférée sur plaque de 96 puits puis la lecture de la fluorescence est réalisée par le spectrophotomètre Flexstation 3 de Molecular Devices. La longueur d'onde d'excitation est de 355 nm et la longueur d'onde d'émission de 480 nm. Pour déterminer les concentrations de catécholamines, la densité optique obtenue pour l'échantillon est comparée à celles de la gamme étalon, analysée puis convertie à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6.04.

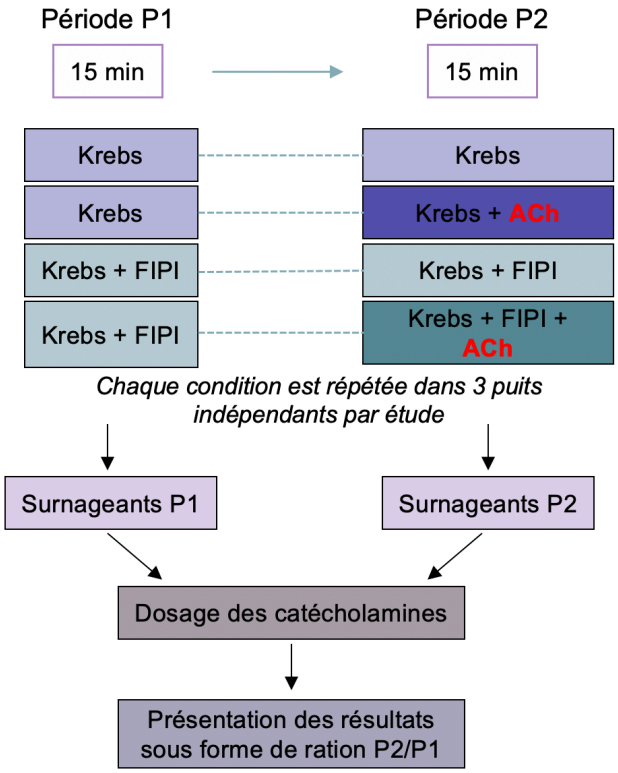


Figure n°41. Protocole utilisé pour le dosage des catécholamines. Deux périodes d'incubation (P1 et P2) successives de 15 min ont été réalisées afin de doser au sein des surnageants les catécholamines sécrétées en condition basale ou stimulée (ACh 20 µM) et en absence ou présence de FIPI (100 nM). Les résultats ont été présentés sous forme de ratio P2/P1 afin de normaliser les résultats en prenant en compte les taux de base de sécrétion.

III. Résultats complémentaires : conditions d'internalisation du PA-NBD ou PA-TMR *in cellulo*

Le protocole décrit ci-dessous provient de l'adaptation de l'étude de l'équipe de Gomez-Cambronero (Henkels et al., 2016) à nos conditions et à nos diverses lignées cellulaires.

Dans un premier temps, la solution stock de PA-NBD ou PA-TMR à 1 mM a été préparée en reprenant 1 mg de PA-NBD/PA-TMR dans 1,4 ml de « stock buffer » constitué de 50 mg de

BSA sans acides gras dans 10 ml de PBS 1X, pH 7,2. Cette solution stock a ensuite été soniquée 2 fois durant 4 secondes sur glace à amplitude moyenne (50 %) avec une pause de 4 secondes entre les sonications, permettant la formation de liposomes de petites tailles.
Ensuite, afin de pouvoir être utilisée *in cellulo*, ces liposomes concentrés à 1 mM sont dilués afin d'obtenir une solution intermédiaire concentrée à 100 µM, en utilisant 20 µl de la solution stock de PA-NBD/PA-TMR et 180 µl de « cell starvation media » (DMEM + 0,1 % de BSA ne contenant pas d'acides gras).
Cette solution intermédiaire à 100 µM est ensuite diluée dans du DMEM afin préparer les concentrations finales de PA-NBD, à savoir : 0,5 µg/mL et 1 µg/mL et de PA-TMR, à savoir : 5 µg/mL et 10 µg/mL.

Afin de pouvoir élucider le comportement de certains lipides et/ou d'étudier les interactions protéines-lipides in cellulo, ceux-ci doivent être couplés à des molécules pouvant être suivies dans la cellule (fluorochrome, radioactivité) puis ensuite, ils doivent être intercalés/pénétrer dans les membranes cellulaires. Pour répondre à ces questions biologiques, plusieurs méthodes ont été développées et améliorées au cours des dernières décennies de recherche sur les membranes.

Le moyen le plus simple mais le moins efficace est l'incubation de cellules vivantes dans un milieu supplémenté en lipides fluorescents. Dans ce cas, une petite quantité de lipides marqués est absorbée par endocytose cellulaire tandis que d'autres molécules sont déplacées dans ou à travers la membrane plasmique par des flippases (Pomorski and Menon, 2006)*. Par exemple, le céramide Bodipy FL, peut être efficacement incorporée dans les cellules de cette manière. Il s'accumule principalement dans l'appareil de Golgi, son site d'accumulation primaire, et dans une moindre mesure dans le réticulum endoplasmique, son site de synthèse* (Gault et al., 2010; Pagano et al., 1991)*. Par conséquent, ce lipide marqué est largement utilisé dans les études de biologie cellulaire pour l'identification et la coloration de ces compartiments cellulaires* (Terasaki et al., 1998)*. Certaines autres molécules amphipathiques artificielles de la série Di fluorescente, par exemple, DiO et certains DiI, peuvent également être facilement et efficacement intégrées au sein des cellules par ce biais* (Honig and Hume, 1986)*. Cependant, la structure de ces molécules n'imite aucun composant naturel de la membrane et donc, bien que le mouvement de flip-flop réalisé par les flippases soit un mécanisme d'incorporation efficace pour certains des lipides mentionnés ci-dessus, il échoue pour la plupart des lipides membranaires. De plus, l'efficacité de l'absorption des lipides est dans la plupart des cas faible, ce qui entraîne des signaux fluorescents de faible intensité et une détection problématique.*

Pagano et collaborateurs ont décrit une autre technique au début des années 80 pour augmenter l'absorption des lipides (Lipsky and Pagano, 1985)*. Sa méthode repose sur*

l'incubation de cellules vivantes avec des lipides fluorescents complexés à la BSA à des températures basses, par exemple 4°C pendant 30 minutes, puis une augmentation rapide de la température à 37°C. L'incubation à basse température provoque l'activation des mécanismes cellulaires protecteurs et entraîne un ralentissement des fonctions cellulaires. Avec l'augmentation des températures, les fonctions cellulaires sont accélérées, y compris l'absorption par endocytose des lipides fluorescents. Après absorption lipidique, les molécules fluorescentes sont adressées aux organites cellulaires en fonction de leurs propriétés biologiques permettant une imagerie microscopique. Les travaux pionniers de Pagano ont permis pour la première fois un suivi via la fluorescence du trafic lipidique au sein des cellules vivantes. Pour autant, cette méthode présente aussi quelques inconvénients. Par exemple, l'incubation à basse température provoque des réponses au stress cellulaire (Sonna et al., 2002; Thieringer et al., 1998)*. De plus, l'absorption par endocytose des lipides complexés à la BSA produit des intensités de signal fluorescent qui sont encore faibles, ce qui rend la détection de la fluorescence difficile.*

Pour éliminer ces inconvénients, afin d'incorporer in cellulo nos PA fluorescents, nous avons adapté un protocole déjà utilisé par l'équipe de Gomez-Cambronero (Henkels et al., 2016)*. Ainsi, nous avons utilisé une nouvelle méthode permettant l'insertion directe des lipides dans les cellules et dans la membrane plasmique via la formation liposomes de petite taille couplés à des molécules de BSA. Ainsi, les PA fluorescents sont intégrés dans les cellules par deux voies différentes :*

- *La fusion entre les liposomes formés de PA fluorescents et la membrane plasmique permet aux PA fluorescents de s'insérer dans la membrane plasmique modifiant ainsi sa composition.*
- *Le couplage des liposomes constitués de PA fluorescents avec la BSA qui se comporte comme une molécule porteuse, permet également aux liposomes de pénétrer par endocytose au sein des cellules. Ensuite, les liposomes sont adressés aux compartiments intracellulaires en fonction des propriétés biochimiques présentes in cellulo.*

Dans ces conditions, le marquage est observé au niveau de la membrane plasmique et au niveau des compartiments intracellulaires des cellules vivantes dans des conditions de culture cellulaire classiques sans pour autant provoquer une réponse au stress. À l'heure actuelle, il semble que cette technique soit la plus adaptée afin de pouvoir permettre au PA (petit lipide chargé négativement) de pénétrer au sein des cellules.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

~ A ~

Aardal, S., Helle, K.B., Elsayed, S., Reed, R.K., and Serck-Hanssen, G. (1993). Vasostatins, Comprising the N-terminal Domain of Chromogranin A, Suppress Tension in Isolated Human Blood Vessel Segments. J. Neuroendocrinol. *5*, 405–412.

Abbineni, P.S., Bittner, M.A., Axelrod, D., and Holz, R.W. (2019). Chromogranin A, the major lumenal protein in chromaffin granules, controls fusion pore expansion. J. Gen. Physiol. *151*, 118–130.

Adachi, Y., Itoh, K., Yamada, T., Cerveny, K.L., Suzuki, T.L., Macdonald, P., Frohman, M.A., Ramachandran, R., Iijima, M., and Sesaki, H. (2016). Coincident Phosphatidic Acid Interaction Restrains Drp1 in Mitochondrial Division. Mol. Cell *63*, 1034–1043.

Adachi, Y., Iijima, M., and Sesaki, H. (2018). An unstructured loop that is critical for interactions of the stalk domain of Drp1 with saturated phosphatidic acid. Small GTPases *9*, 472–479.

Ahras, M., Otto, G.P., and Tooze, S.A. (2006). Synaptotagmin IV is necessary for the maturation of secretory granules in PC12 cells. J. Cell Biol. *173*, 241–251.

Ait-Ali, D., Turquier, V., Tanguy, Y., Thouënnon, E., Ghzili, H., Mounien, L., Derambure, C., Jégou, S., Salier, J.P., Vaudry, H., et al. (2008). Tumor necrosis factor (TNF)-α persistently activates nuclear factor-κB signaling through the type 2 TNF receptor in chromaffin cells: Implications for long-term regulation of neuropeptide gene expression in inflammation. Endocrinology *149*, 2840–2852.

Alabi, A.A., and Tsien, R.W. (2013). Perspectives on kiss-and-run: role in exocytosis, endocytosis, and neurotransmission. Annu. Rev. Physiol. *75*, 393–422.

Allersma, M.W., Wang, L., Axelrod, D., and Holz, R.W. (2004). Visualization of regulated exocytosis with a granule-membrane probe using total internal reflection microscopy. Mol. Biol. Cell *15*, 4658–4668.

Allersma, M.W., Bittner, M.A., Axelrod, D., and Holz, R.W. (2006). Motion matters: Secretory granule motion adjacent to the plasma membrane and exocytosis. Mol. Biol. Cell *17*, 2424–2438.

Almeida, C.G., Yamada, A., Tenza, D., Louvard, D., Raposo, G., and Coudrier, E. (2011). Myosin 1b promotes the formation of post-Golgi carriers by regulating actin assembly and membrane remodelling at the trans-Golgi network. Nat. Cell Biol. *13*, 779–789.

Ammar, M.R., Kassas, N., Chasserot-Golaz, S., Bader, M.F., and Vitale, N. (2013). Lipids

in regulated exocytosis: What are they doing? Front. Endocrinol. (Lausanne). *4*, 1–7.

An, S., and Zenisek, D. (2004). Regulation of exocytosis in neurons and neuroendocrine cells. Curr. Opin. Neurobiol. *14*, 522–530.

Anantharam, A., Bittner, M.A., Aikman, R.L., Stuenkel, E.L., Schmid, S.L., Axelrod, D., and Holz, R.W. (2011). A new role for the dynamin GTPase in the regulation of fusion pore expansion. Mol. Biol. Cell *22*, 1907–1918.

Andreyev, A.Y., Fahy, E., Guan, Z., Kelly, S., Li, X., McDonald, J.G., Milne, S., Myers, D., Park, H., Ryan, A., et al. (2010). Subcellular organelle lipidomics in TLR-4-activated macrophages. J. Lipid Res. *51*, 2785–2797.

Angelova, M.I., and Dimitrov, D.S. (1986). Liposome electroformation. Faraday Discuss. Chem. Soc. *81*, 303–311.

Anouar, Y., Benie, T., de Monti, M., Counis, R., and Duval, J. (1991). Estradiol negatively regulates secretogranin ii and chromogranin a messenger ribonucleic acid levels in the female rat pituitary but not in the adrenal. Endocrinology *129*, 2393–2399.

Anouar, Y., MacArthur, L., Cohen, J., Iacangelo, A.L., and Eiden, L.E. (1994). Identification of a TPA-responsive element mediating preferential transactivation of the galanin gene promoter in chromaffin cells. J. Biol. Chem. *269*, 6823–6831.

Arnaoutova, I., Cawley, N.X., Patel, N., Kim, T., Rathod, T., and Loh, Y.P. (2008). Aquaporin 1 is important for maintaining secretory granule biogenesis in endocrine cells. Mol. Endocrinol. *22*, 1924–1934.

Arora, A., and Tamm, L.K. (2001). Biophysical approaches to membrane protein structure determination. Curr. Opin. Struct. Biol. *11*, 540–547.

Artalejo, C.R., Elhamdani, A., and Palfrey, H.C. (2002). Sustained stimulation shifts the mechanism of endocytosis from dynamin-1-dependent rapid endocytosis to clathrin- and dynamin-2-mediated slow endocytosis in chromaffin cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 6358–6363.

Arvan, P., and Castle, D. (1998). Sorting and storage during secretory granule biogenesis: Looking backward and looking forward. Biochem. J. *332*, 593–610.

Asensio, C.S., Sirkis, D.W., and Edwards, R.H. (2010). RNAi screen identifies a role for adaptor protein AP-3 in sorting to the regulated secretory pathway. J. Cell Biol. *191*, 1173–1187.

Assadi, M., Sharpe, J.C., Snell, C., and Loh, Y.P. (2004). The C-terminus of prohormone convertase 2 is sufficient and necessary for Raft association and sorting to the regulated secretory pathway. Biochemistry *43*, 7798–7807.

Aunis, D., and Metz-Boutigue, M.H. (2001). Chromogranines: De la découverte à la fonction. Medecine/Sciences *17*, 418–427.

~ B ~

Bacia, K., Schwille, P., and Kurzchalia, T. (2005). Sterol structure determines the separation of phases and the curvature of the liquid-ordered phase in model membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 3272–3277.

Bader, M.-F., Doussau, F., Chasserot-Golaz, S., Vitale, N., and Gasman, S. (2004). Coupling actin and membrane dynamics during calcium-regulated exocytosis: a role for Rho and ARF GTPases. Biochim. Biophys. Acta *1742*, 37–49.

Baillie, G.S., Huston, E., Scotland, G., Hodgkin, M., Gall, I., Peden, A.H., MacKenzie, C., Houslay, E.S., Currie, R., Pettitt, T.R., et al. (2002). TAPAS-1, a novel microdomain within the unique N-terminal region of the PDE4A1 cAMP-specific phosphodiesterase that allows rapid, Ca2+-triggered membrane association with selectivity for interaction with phosphatidic acid. J. Biol. Chem. *277*, 28298–28309.

Baker, R.W., and Hughson, F.M. (2016). Chaperoning SNARE assembly and disassembly. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *17*, 465–479.

Balboa, M.A., and Insel, P.A. (1995). Nuclear phospholipase D in madin-darby canine kidney cells: Guanosine 5′-O-(thiotriphosphate)-stimulated activation is mediated by RhoA and is downstream of protein kinase C. J. Biol. Chem. *270*, 29843–29847.

Banks, P., and Helle, K. (1965). The Release of Protein from the Stimulated Adrenal Medulla. Biochem. J. *97*, 40C-41C.

Barg, S., and Machado, J.D. (2008). Compensatory endocytosis in chromaffin cells. Acta Physiol. *192*, 195–201.

Bartolomucci, A., Possenti, R., Mahata, S.K., Fischer-Colbrie, R., Loh, Y.P., and Salton, S.R.J. (2011). The extended granin family: Structure, function, and biomedical implications. Endocr. Rev. *32*, 755–797.

Basso, L.G.M., Mendes, L.F.S., and Costa-Filho, A.J. (2016). The two sides of a lipid-protein story. Biophys. Rev. *8*, 179–191.

Bauer, R.A., Khera, R.S., Lieber, J.L., and Angleson, J.K. (2004). Recycling of intact dense core vesicles in neurites of NGF-treated PC12 cells. FEBS Lett. *571*, 107–111.

Bauerfeind, R., and Huttner, W.B. (1993). Biogenesis of constitutive secretory vesicles, secretory granules and synaptic vesicles. Curr. Opin. Cell Biol. *5*, 628–635.

Beck, R., Sun, Z., Adolf, F., Rutz, C., Bassler, J., Wild, K., Sinning, I., Hurt, E., Brügger, B., Béthune, J., et al. (2008). Membrane curvature induced by Arf1-GTP is essential for vesicle formation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 11731–11736.

Benedeczky, I., and Somogyi, P. (1978). Cytochemical localization of exogenous peroxidase in adrenal medullary cells of hamster. Acta Biol. Acad. Sci. Hung. *29*, 155–163.

Betz, A., Okamoto, M., Benseler, F., and Brose, N. (1997). Direct interaction of the rat unc-

13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin. J. Biol. Chem. *272*, 2520–2526.

Bi, K., Roth, M.G., and Ktistakis, N.T. (1997). Phosphatidic acid formation by phospholipase D is required for transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. Curr. Biol. *7*, 301–307.

Billuart, P., Bienvenu, T., Roncet, N., Des Portes, V., Vinet, M.C., Zemni, R., Crollius, H.R., Carrié, A., Fauchereau, F., Cherry, M., et al. (1998). Oligophrenin-1 encodes a rhoGAP protein involved in X-linked mental retardation. Nature *392*, 923–926.

Biswas, N., Rodriguez-Flores, J.L., Courel, M., Gayen, J.R., Vaingankar, S.M., Mahata, M., Torpey, J.W., Taupenot, L., O'Connor, D.T., and Mahata, S.K. (2009). Cathepsin L colocalizes with chromogranin a in chromaffin vesicles to generate active peptides. Endocrinology *150*, 3547–3557.

Bittner, M.A., Aikman, R.L., and Holz, R.W. (2013). A nibbling mechanism for clathrin-mediated retrieval of secretory granule membrane after exocytosis. J. Biol. Chem. *288*, 9177–9188.

Blaschko, H., Comline, R.S., Schneider, F.H., Silver, M., and Smith, A.D. (1967). Secretion of a chromaffin granule protein, chromogranin, from the adrenal gland after splanchnic stimulation. Nature *215*, 58–59.

Blázquez, M., and Shennan, K.I. (2000). Basic mechanisms of secretion: sorting into the regulated secretory pathway. Biochem. Cell Biol. *78*, 181–191.

Blois, A., Holmsen, H., Martino, G., Corti, A., Metz-Boutigue, M.H., and Helle, K.B. (2006). Interactions of chromogranin A-derived vasostatins and monolayers of phosphatidylserine, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. Regul. Pept. *134*, 30–37.

Boughriet, A., Ladjadj, M., and Bicknell-Brown, E. (1988). Calcium-induced condensation-reorganization phenomena in multilamellar vesicles of phosphatidic acid. pH potentiometric and 31P-NMR, Raman and ESR spectroscopic studies. BBA - Biomembr. *939*, 523–532.

Brandhorst, D., Zwilling, D., Rizzoli, S.O., Lippert, U., Lang, T., and Jahn, R. (2006). Homotypic fusion of early endosomes: SNAREs do not determine fusion specificity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 2701–2706.

Brechler, V., Chu, W.N., Baxter, J.D., Thibault, G., and Reudelhuber, T.L. (1996). A protease processing site is essential for prorenin sorting to the regulated secretory pathway. J. Biol. Chem. *271*, 20636–20640.

Breton, M., Amirkavei, M., and Mir, L.M. (2015). Optimization of the Electroformation of Giant Unilamellar Vesicles (GUVs) with Unsaturated Phospholipids. J. Membr. Biol. *248*, 827–835.

Brown, F.D., Thompson, N., Saqib, K.M., Clark, J.M., Powner, D., Thompson, N.T., Solari, R., and Wakelam, M.J.O. (1998). Phospholipase D1 localises to secretory granules and lysosomes and is plasma-membrane translocated on cellular stimulation. Curr. Biol. *8*, 835–

838.

Brown, H.A., Gutowski, S., Moomaw, C.R., Slaughter, C., and Sternweis, P.C. (1993). ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. Cell *75*, 1137–1144.

Brunger, A.T. (2000). Structural insights into the molecular mechanism of Ca2+-dependent exocytosis. Curr. Opin. Neurobiol. *10*, 293–302.

Bundgaard, J.R., Birkedal, H., and Rehfeld, J.F. (2004). Progastrin Is Directed to the Regulated Secretory Pathway by Synergistically Acting Basic and Acidic Motifs. J. Biol. Chem. *279*, 5488–5493.

Burgoyne, R.D., and Morgan, A. (2003). Secretory Granule Exocytosis.

~ C ~

Canaff, L., Brechler, V., Reudelhuber, T.L., and Thibault, G. (1996). Secretory granule targeting of atrial natriuretic peptide correlates with its calcium-mediated aggregation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *93*, 9483–9487.

Cano, R., and Tabares, L. (2016). The active and periactive zone organization and the functional properties of small and large synapses. Front. Synaptic Neurosci. *8*, 12.

Cao, M., Mao, Z., Kam, C., Xiao, N., Cao, X., Shen, C., Cheng, K.K.Y., Xu, A., Lee, K.M., Jiang, L., et al. (2013). PICK1 and ICA69 Control Insulin Granule Trafficking and Their Deficiencies Lead to Impaired Glucose Tolerance. PLoS Biol. *11*.

Capelluto, D.G.S., Zhao, X., Lucas, A., Lemkul, J.A., Xiao, S., Fu, X., Sun, F., Bevan, D.R., and Finkielstein, C. V. (2014). Biophysical and molecular-dynamics studies of phosphatidic acid binding by the Dvl-2 DEP domain. Biophys. J. *106*, 1101–1111.

Carman, G.M., and Henry, S.A. (2007). Phosphatidic acid plays a central role in the transcriptional regulation of glycerophospholipid synthesis in Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. *282*, 37293–37297.

Carmon, O., Laguerre, F., Riachy, L., Delestre-Delacour, C., Wang, Q., Tanguy, E., Jeandel, L., Cartier, D., Thahouly, T., Haeberlé, A.M., et al. (2020). Chromogranin A preferential interaction with Golgi phosphatidic acid induces membrane deformation and contributes to secretory granule biogenesis. FASEB J. *34*, 6769–6790.

Cawley, N.X., Normant, E., Chen, A., and Loh, Y.P. (2000). Oligomerization of pro-opiomelanocortin is independent of pH, calcium and the sorting signal for the regulated secretory pathway. FEBS Lett. *481*, 37–41.

Cawley, N.X., Rathod, T., Young, S., Lou, H., Birch, N., and Peng Loh, Y. (2016). Carboxypeptidase E and secretogranin III coordinately facilitate efficient sorting of proopiomelanocortin to the regulated secretory pathway in AtT20 cells. Mol. Endocrinol. *30*,

37–47.

Cazzolli, R., Shemon, A.N., Fang, M.Q., and Hughes, W.E. (2006). Phospholipid signalling through phospholipase D and phosphatidic acid. IUBMB Life *58*, 457–461.

Ceridono, M., Ory, S., Momboisse, F., Chasserot-Golaz, S., Houy, S., Calco, V., Haeberlé, A.M., Demais, V., Bailly, Y., Bader, M.F., et al. (2011). Selective recapture of secretory granule components after full collapse exocytosis in neuroendocrine chromaffin cells. Traffic *12*, 72–88.

Chakraborty, T.R., Tkalych, O., Nanno, D., Garcia, A.L., Devi, L.A., and Salton, S.R.J. (2006). Quantification of VGF- and pro-SAAS-derived peptides in endocrine tissues and the brain, and their regulation by diet and cold stress. Brain Res. *1089*, 21–32.

Chanat, E., and Huttner, W.B. (1991). Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the trans-Golgi network. J. Cell Biol. *115*, 1505–1519.

Chapman, E.R. (2008). How Does Synaptotagmin Trigger Neurotransmitter Release? Annu. Rev. Biochem. *77*, 615–641.

Chen, Q., Hongu, T., Sato, T., Zhang, Y., Ali, W., Cavallo, J.A., Van Der Velden, A., Tian, H., Di Paolo, G., Nieswandt, B., et al. (2012). Key roles for the lipid signaling enzyme phospholipase D1 in the tumor microenvironment during tumor angiogenesis and metastasis. Sci. Signal. *5*.

Chen, Y.G., Siddhanta, A., Austin, C.D., Hammond, S.M., Sung, T.C., Frohman, M.A., Morris, A.J., and Shields, D. (1997). Phospholipase D stimulates release of nascent secretory vesicles from the trans-Golgi network. J. Cell Biol. *138*, 495–504.

Cho, G.W., Kim, M.H., Chai, Y.G., Gilmor, M.L., Levey, A.I., and Hersh, L.B. (2000). Phosphorylation of the rat vesicular acetylcholine transporter. J. Biol. Chem. *275*, 19942–19948.

Cho, S.J., Abdus Sattar, A.K.M., Jeong, E.H., Satchi, M., Cho, J.A., Dash, S., Mayes, M.S., Stromer, M.H., and Jena, B.P. (2002). Aquaporin 1 regulates GTP-induced rapid gating of water in secretory vesicles. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 4720–4724.

Choi, S.-Y., Huang, P., Jenkins, G.M., Chan, D.C., Schiller, J., and Frohman, M.A. (2006). A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. Nat. Cell Biol. *8*, 1255–1262.

Choi, W.S., Chahdi, A., Kim, Y.M., Fraundorfer, P.F., and Beaven, M.A. (2002). Regulation of phospholipase D and secretion in mast cells by protein kinase A and other protein kinases. Ann. N. Y. Acad. Sci. *968*, 198–212.

Chrétien, M., and Mbikay, M. (2016). 60 YEARS OF POMC: From the prohormone theory to pro-opiomelanocortin and to proprotein convertases (PCSK1 to PCSK9). J. Mol. Endocrinol. *56*, T49-62.

Chu, W.N., Baxter, J.D., and Reudelhuber, T.L. (1990). A targeting sequence for dense

secretory granules resides in the active renin protein moiety of human preprorenin. Mol. Endocrinol. *4*, 1905–1913.

Cochilla, A.J., Angleson, J.K., and Betz, W.J. (2000). Differential regulation of granule-to-granule and granule-to-plasma membrane fusion during secretion from rat pituitary lactotrophs. J. Cell Biol. *150*, 839–848.

Colley, W.C., Sung, T.C., Roll, R., Jenco, J., Hammond, S.M., Altshuller, Y., Bar-Sagi, D., Morris, A.J., and Frohman, M.A. (1997). Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. Curr. Biol. *7*, 191–201.

Contreras, F.X., Ernst, A.M., Haberkant, P., Björkholm, P., Lindahl, E., Gönen, B., Tischer, C., Elofsson, A., Von Heijne, G., Thiele, C., et al. (2012). Molecular recognition of a single sphingolipid species by a protein's transmembrane domain. Nature *481*, 525–529.

Cool, D.R., Fenger, M., Snell, C.R., and Loh, Y.P. (1995). Identification of the sorting signal motif within pro-opiomelanocortin for the regulated secretory pathway. J. Biol. Chem. *270*, 8723–8729.

Cool, D.R., Normant, E., Shen, F.S., Chen, H.C., Pannell, L., Zhang, Y., and Loh, Y.P. (1997). Carboxypeptidase E is a regulated secretory pathway sorting receptor: Genetic obliteration leads to endocrine disorders in Cpe(fat) mice. Cell *88*, 73–83.

Corda, D., Carcedo, C.H., Bonazzi, M., Luini, A., and Spanò, S. (2002). Molecular aspects of membrane fission in the secretory pathway. Cell. Mol. Life Sci. *59*, 1819–1832.

Corti, A. (2010). Chromogranin A and the tumor microenvironment. Cell. Mol. Neurobiol. *30*, 1163–1170.

Crump, C.M., Xiang, Y., Thomas, L., Gu, F., Austin, C., Tooze, S.A., and Thomas, G. (2001). PACS-1 binding to adaptors is required for acidic cluster motif-mediated protein traffic. EMBO J. *20*, 2191–2201.

Cruz-Garcia, D., Ortega-Bellido, M., Scarpa, M., Villeneuve, J., Jovic, M., Porzner, M., Balla, T., Seufferlein, T., and Malhotra, V. (2013). Recruitment of arfaptins to the trans-Golgi network by PI(4)P and their involvement in cargo export. EMBO J. *32*, 1717–1729.

~ D ~

Dannies, P.S. (1999). Protein Hormone Storage in Secretory Granules: Mechanisms for Concentration and Sorting 1 . Endocr. Rev. *20*, 3–21.

Dannies, P.S. (2012). Prolactin and Growth Hormone Aggregates in Secretory Granules: The Need to Understand the Structure of the Aggregate. Endocr. Rev. *33*, 254–270.

Darios, F., Connell, E., and Davletov, B. (2007). Phospholipases and fatty acid signalling in exocytosis. In Journal of Physiology, pp. 699–704.

Decker, C., Miro Obradors, M.J., Sillence, D.J., and Allan, D. (1996). Phorbol ester-sensitive phospholipase D is mainly localized in the endoplasmic reticulum of BHK cells. Biochem. J. *320*, 885–890.

Delestre-Delacour, C., Carmon, O., Laguerre, F., Estay-Ahumada, C., Courel, M., Elias, S., Jeandel, L., Rayo, M.V., Peinado, J.R., Sengmanivong, L., et al. (2017). Myosin 1b and F-actin are involved in the control of secretory granule biogenesis. Sci. Rep. *7*.

Delvendahl, I., Vyleta, N.P., von Gersdorff, H., and Hallermann, S. (2016). Fast, Temperature-Sensitive and Clathrin-Independent Endocytosis at Central Synapses. Neuron *90*, 492–498.

Demaurex, N., Furuya, W., D'Souza, S., Bonifacino, J.S., and Grinstein, S. (1998). Mechanism of acidification of the trans-Golgi network (TGN): In situ measurements of pH using retrieval of TGN38 and furin from the cell surface. J. Biol. Chem. *273*, 2044–2051.

Dergai, M., Tsyba, L., Dergai, O., Zlatskii, I., Skrypkina, I., Kovalenko, V., and Rynditch, A. (2010). Microexon-based regulation of ITSN1 and Src SH3 domains specificity relies on introduction of charged amino acids into the interaction interface. Biochem. Biophys. Res. Commun. *399*, 307–312.

Desnos, C., Schonn, J.-S., Huet, S., Tran, V.S., El-Amraoui, A., Raposo, G., Fanget, I., Chapuis, C., Ménasché, G., de Saint Basile, G., et al. (2003). Rab27A and its effector MyRIP link secretory granules to F-actin and control their motion towards release sites. J. Cell Biol. *163*, 559–570.

Desnos, C., Huet, S., Fanget, I., Chapuis, C., Böttiger, C., Racine, V., Sibarita, J.B., Henry, J.P., and Darchen, F. (2007). Myosin Va mediates docking of secretory granules at the plasma membrane. J. Neurosci. *27*, 10636–10645.

Dhanvantari, S., and Loh, Y.P. (2000). Lipid Raft Association of Carboxypeptidase E Is Necessary for Its Function as a Regulated Secretory Pathway Sorting Receptor. J. Biol. Chem. *275*, 29887–29893.

Dhanvantari, S., Arnaoutova, I., Snell, C.R., Steinbach, P.J., Hammond, K., Caputo, G.A., London, E., and Loh, Y.P. (2002). Carboxypeptidase E, a prohormone sorting receptor, is anchored to secretory granules via a C-terminal transmembrane insertion. Biochemistry *41*, 52–60.

Dhanvantari, S., Shen, F.-S., Adams, T., Snell, C.R., Zhang, C., Mackin, R.B., Morris, S.J., and Loh, Y.P. (2003). Disruption of a receptor-mediated mechanism for intracellular sorting of proinsulin in familial hyperproinsulinemia. Mol. Endocrinol. *17*, 1856–1867.

Diao, J., Grob, P., Cipriano, D.J., Kyoung, M., Zhang, Y., Shah, S., Nguyen, A., Padolina, M., Srivastava, A., Vrljic, M., et al. (2012). Synaptic proteins promote calcium-triggered fast transition from point contact to full fusion. Elife *2012*, e00109.

Diguet, A., Le Berre, M., Chen, Y., and Baigl, D. (2009). Preparation of phospholipid

multilayer patterns of controlled size and thickness by capillary assembly on a microstructured substrate. Small *5*, 1661–1666.

van Dijck, P.W.M., de Kruijff, B., Verkleij, A.J., van Deenen, L.L.M., and de Gier, J. (1978). Comparative studies on the effects of pH and Ca2+ on bilayers of various negatively charged phospholipids and their mixtures with phosphatidylcholine. BBA - Biomembr. *512*, 84–96.

Dikeakos, J.D., and Reudelhuber, T.L. (2007). Sending proteins to dense core secretory granules: Still a lot to sort out. J. Cell Biol. *177*, 191–196.

Dikeakos, J.D., Di Lello, P., Lacombe, M.-J., Ghirlando, R., Legault, P., Reudelhuber, T.L., and Omichinski, J.G. (2009). Functional and structural characterization of a dense core secretory granule sorting domain from the PC1/3 protease. Proc. Natl. Acad. Sci. *106*, 7408–7413.

Dillen, L., Miserez, B., Claeys, M., Aunis, D., and De Potter, W. (1993). Posttranslational processing of proenkephalins and chromogranins/secretogranins. Neurochem. Int. *22*, 315–352.

Dittié, A.S., Hajibagheri, N., and Tooze, S.A. (1996). The AP-1 adaptor complex binds to immature secretory granules from PC12 cells, and is regulated by ADP-ribosylation factor. J. Cell Biol. *132*, 523–536.

Dittié, A.S., Thomas, L., Thomas, G., and Tooze, S.A. (1997). Interaction of furin in immature secretory granules from neuroendocrine cells with the AP-1 adaptor complex is modulated by casein kinase II phosphorylation. EMBO J. *16*, 4859–4870.

Dominguez, N., Estevez-Herrera, J., Borges, R., and Machado, J.D. (2014). The interaction between chromogranin A and catecholamines governs exocytosis. FASEB J. *28*, 4657–4667.

Dondossola, E., Gasparri, A., Bachi, A., Longhi, R., Metz-Boutigue, M.-H., Tota, B., Helle, K.B., Curnis, F., and Corti, A. (2010). Role of vasostatin-1 C-terminal region in fibroblast cell adhesion. Cell. Mol. Life Sci. *67*, 2107–2118.

Dowler, S., Kular, G., and Alessi, D.R. (2002). Protein lipid overlay assay. Sci. STKE *2002*, pl6.

Du, G., Altshuller, Y.M., Vitale, N., Huang, P., Chasserot-Golaz, S., Morris, A.J., Bader, M.-F., and Frohman, M.A. (2003). Regulation of phospholipase D1 subcellular cycling through coordination of multiple membrane association motifs. J. Cell Biol. *162*, 305–315.

Dubois, T., Paléotti, O., Mironov, A.A., Fraisier, V., Stradal, T.E.B., De Matteis, M.A., Franco, M., and Chavrier, P. (2005). Golgi-localized GAP for Cdc42 functions downstream of ARF1 to control Arp2/3 complex and F-actin dynamics. Nat. Cell Biol. *7*, 353–364.

Dulubova, I., Sugita, S., Hill, S., Hosaka, M., Fernandez, I., Südhof, T.C., and Rizo, J. (1999). A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. EMBO J. *18*, 4372–4382.

Dulubova, I., Khvotchev, M., Liu, S., Huryeva, I., Südhof, T.C., and Rizo, J. (2007). Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 2697–2702.

~ E ~

Eaton, B.A., Haugwitz, M., Lau, D., and Moore, H.P.H. (2000). Biogenesis of regulated exocytotic carriers in neuroendocrine cells. J. Neurosci. *20*, 7334–7344.

Edwards, S.L., Charlie, N.K., Richmond, J.E., Hegermann, J., Eimer, S., and Miller, K.G. (2009). Impaired dense core vesicle maturation in Caenorhabditis elegans mutants lacking Rab2. J. Cell Biol. *186*, 881–895.

Eiden, L.E. (1987). Is chromogranin a prohormone? Nature *325*, 301.

Eissa, N., Hussein, H., Hendy, G.N., Bernstein, C.N., Ghia, J.E. (2018). Chromogranin-A and its derived peptides and their pharmacological effects during intestinal inflammation. Biochem Pharmacol. *152*, 315–326.

Elhamdani, A., Azizi, F., and Artalejo, C.R. (2006). Double patch clamp reveals that transient fusion (kiss-and-run) is a major mechanism of secretion in calf adrenal chromaffin cells: high calcium shifts the mechanism from kiss-and-run to complete fusion. J. Neurosci. *26*, 3030–3036.

Elias, S., Delestre, C., Courel, M., Anouar, Y., and Montero-Hadjadje, M. (2010). Chromogranin A as a crucial factor in the sorting of peptide hormones to secretory granules. Cell. Mol. Neurobiol. *30*, 1189–1195.

Elias, S., Delestre, C., Ory, S., Marais, S., Courel, M., Vazquez-Martinez, R., Bernard, S., Coquet, L., Malagon, M.M., Driouich, A., et al. (2012). Chromogranin A induces the biogenesis of granules with calcium- and actin-dependent dynamics and exocytosis in constitutively secreting cells. Endocrinology *153*, 4444–4456.

Emr, S., Glick, B.S., Linstedt, A.D., Lippincott-Schwartz, J., Luini, A., Malhotra, V., Marsh, B.J., Nakano, A., Pfeffer, S.R., Rabouille, C., et al. (2009). Journeys through the Golgi--taking stock in a new era. J. Cell Biol. *187*, 449–453.

Eskeland, N.L., Zhou, A., Dinh, T.Q., Wu, H., Parmer, R.J., Mains, R.E., and O'Connor, D.T. (1996). Chromogranin A processing and secretion: specific role of endogenous and exogenous prohormone convertases in the regulated secretory pathway. J. Clin. Invest. *98*, 148–156.

Estevez-Herrera, J., Pardo, M.R., Dominguez, N., Pereda, D., Machado, J.D., and Borges, R. (2013). The role of chromogranins in the secretory pathway. Biomol. Concepts *4*, 605–609.

~ F ~

Fan, F., Ji, C., Wu, Y., Ferguson, S.M., Tamarina, N., Philipson, L.H., and Lou, X. (2015).

Dynamin 2 regulates biphasic insulin secretion and plasma glucose homeostasis. J. Clin. Invest. *125*, 4026–4041.

Farren, S.B., Hope, M.J., and Cullis, P.R. (1983). Polymorphic phase preferences of phosphatidic acid: A 31P and 2H NMR study. Biochem. Biophys. Res. Commun. *111*, 675–682.

Fasshauer, D., Antonin, W., Margittai, M., Pabst, S., and Jahn, R. (1999). Mixed and non-cognate SNARE complexes. Characterization of assembly and biophysical properties. J. Biol. Chem. *274*, 15440–15446.

Fei, H., Grygoruk, A., Brooks, E.S., Chen, A., and Krantz, D.E. (2008). Trafficking of vesicular neurotransmitter transporters. Traffic *9*, 1425–1436.

Feliciangeli, S., Kitabgi, P., and Bidard, J.N. (2001). The role of dibasic residues in prohormone sorting to the regulated secretory pathway: A study with proneurotensin. J. Biol. Chem. *276*, 6140–6150.

Ferris, C.D., Huganir, R.L., Supattapone, S., and Snyder, S.H. (1989). Purified inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mediates calcium flux in reconstituted lipid vesicles. Nature *342*, 87–89.

Fischer-Colbrie, R., and Schober, M. (1987). Isolation and characterization of chromogranins A, B, and C from bovine chromaffin granules and a rat pheochromocytoma. J. Neurochem. *48*, 262–270.

Fischer-Colbrie, R., Laslop, A., and Kirchmair, R. (1995). Secretogranin II: Molecular properties, regulation of biosynthesis and processing to the neuropeptide secretoneurin. Prog. Neurobiol. *46*, 49–70.

Fisher, P., and Ungar, D. (2016). Bridging the Gap between Glycosylation and Vesicle Traffic. Front. Cell Dev. Biol. *4*, 15.

Francone, V.P., Ifrim, M.F., Rajagopal, C., Leddy, C.J., Wang, Y., Carson, J.H., Mains, R.E., and Eipper, B.A. (2010). Signaling from the secretory granule to the nucleus: Uhmk1 and PAM. Mol. Endocrinol. *24*, 1543–1558.

Freyberg, Z., Sweeney, D., Siddhanta, A., Bourgoin, S., Frohman, M., and Shields, D. (2001a). Intracellular localization of phospholipase D1 in mammalian cells. Mol. Biol. Cell *12*, 943–955.

Freyberg, Z., Sweeney, D., Siddhanta, A., Bourgoin, S., Frohman, M., and Shields, D. (2001b). Intracellular localization of phospholipase D1 in mammalian cells. Mol. Biol. Cell *12*, 943–955.

Freyberg, Z., Bourgoin, S., and Shields, D. (2002). Phospholipase D2 is localized to the rims of the Golgi apparatus in mammalian cells. Mol. Biol. Cell *13*, 3930–3942.

Freyberg, Z., Siddhanta, A., and Shields, D. (2003). "Slip, sliding away": phospholipase D and the Golgi apparatus. Trends Cell Biol. *13*, 540–546.

Frohman, M.A. (2015). The phospholipase D superfamily as therapeutic targets. Trends Pharmacol. Sci. *36*, 137–144.

Fucini, R. V., Navarrete, A., Vadakkan, C., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Stamnes, M. (2000). Activated ADP-ribosylation factor assembles distinct pools of actin on Golgi membranes. J. Biol. Chem. *275*, 18824–18829.

Fulop, T., Radabaugh, S., and Smith, C. (2005). Activity-dependent differential transmitter release in mouse adrenal chromaffin cells. J. Neurosci. *25*, 7324–7332.

Futerman, A.H., and Riezman, H. (2005). The ins and outs of sphingolipid synthesis. Trends Cell Biol. *15*, 312–318.

~ G ~

Gabel, M., Royer, C., Thahouly, T., Bader, M., Vitale, N., and Chasserot-golaz, S. (2020). Annexin A2 Egress during Calcium-Regulated Exocytosis in Neuroendocrine Cells. Cells 1–14.

Garwicz, D., Lindmark, A., and Gullberg, U. (1995). Human cathepsin G lacking functional glycosylation site is proteolytically processed and targeted for storage in granules after transfection to the rat basophilic/mast cell line RBL or the murine myeloid cell line 32D. J. Biol. Chem. *270*, 28413–28418.

Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., Hubert, P., Aunis, D., and Bader, M.F. (1998). Identification of a potential effector pathway for the trimeric Go protein associated with secretory granules. J. Biol. Chem. *273*, 16913–16920.

Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., Malacombe, M., Way, M., and Bader, M.F. (2004). Regulated Exocytosis in Neuroendocrine Cells: A Role for Subplasmalemmal Cdc42/N-WASP-induced Actin Filaments. Mol. Biol. Cell *15*, 520–531.

Gault, C.R., Obeid, L.M., and Hannun, Y.A. (2010). An overview of sphingolipid metabolism: From synthesis to breakdown. Adv. Exp. Med. Biol. *688*, 1–23.

Gehart, H., Goginashvili, A., Beck, R., Morvan, J., Erbs, E., Formentini, I., De Matteis, M.A., Schwab, Y., Wieland, F.T., and Ricci, R. (2012). The BAR Domain Protein Arfaptin-1 Controls Secretory Granule Biogenesis at the trans-Golgi Network. Dev. Cell *23*, 756–768.

Gerdes, H.H., Rosa, P., Phillips, E., Baeuerle, P.A., Frank, R., Argos, P., and Huttner, W.B. (1989). The primary structure of human secretogranin II, a widespread tyrosine-sulfated secretory granule protein that exhibits low pH- and calcium-induced aggregation. J. Biol. Chem. *264*, 12009–12015.

Giraudo, C.G., Eng, W.S., Melia, T.J., and Rothman, J.E. (2006). A clamping mechanism involved in SNARE-dependent exocytosis. Science (80-.). *313*, 676–680.

Godi, A., Di Campli, A., Konstantakopoulos, A., Di Tullio, G., Alessi, D.R., Kular, G.S.,

Daniele, T., Marra, P., Lucocq, J.M., and De Matteis, M.A. (2004). FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P. Nat. Cell Biol. *6*, 393–404.

Gondré-Lewis, M.C., Petrache, H.I., Wassif, C.A., Harries, D., Parsegian, A., Porter, F.D., and Loh, Y.P. (2006). Abnormal sterols in cholesterol-deficiency diseases cause secretory granule malformation and decreased membrane curvature. J. Cell Sci. *119*, 1876–1885.

Gondré-Lewis, M.C., Park, J.J., and Loh, Y.P. (2012). Cellular mechanisms for the biogenesis and transport of synaptic and dense-core vesicles. Int. Rev. Cell Mol. Biol. *299*, 27–115.

Govek, E.E., Newey, S.E., Akerman, C.J., Cross, J.R., Der Veken, L. Van, and Van Aelst, L. (2004). The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. Nat. Neurosci. *7*, 364–372.

Granseth, B., Odermatt, B., Royle, S.J.J., and Lagnado, L. (2006). Clathrin-Mediated Endocytosis Is the Dominant Mechanism of Vesicle Retrieval at Hippocampal Synapses. Neuron *51*, 773–786.

Gravelle, S., Joly, L., Detcheverry, F., Ybert, C., Cottin-Bizonne, C., and Bocquet, L. (2015). Perméabilité optimale des aquaporines - Une histoire de forme ? Médecine/Sciences *31*, 174–179.

Gubar, O., Morderer, D., Tsyba, L., Croisé, P., Houy, S., Ory, S., Gasman, S., and Rynditch, A. (2013). Intersectin: The crossroad between vesicle exocytosis and endocytosis. Front. Endocrinol. (Lausanne). *4*.

Guérin, M., Guillemot, J., Thouënnon, E., Pierre, A., El-Yamani, F.-Z., Montero-Hadjadje, M., Dubessy, C., Magoul, R., Lihrmann, I., Anouar, Y., et al. (2010). Granins and their derived peptides in normal and tumoral chromaffin tissue: Implications for the diagnosis and prognosis of pheochromocytoma. Regul. Pept. *165*, 21–29.

Guipponi, M., Scott, H.S., Hattori, M., Ishii, K., Sakaki, Y., and Antonarakis, S.E. (1998). Genomic structure, sequence, and refined mapping of the human intersectin gene (ITSN), which encompasses 250 kb on chromosome 21q22.1→q22.2. Cytogenet. Cell Genet. *83*, 218–220.

~ H ~

Ha, K.D., Clarke, B.A., and Brown, W.J. (2012). Regulation of the Golgi complex by phospholipid remodeling enzymes. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids *1821*, 1078–1088.

Halban, P.A., and Irminger, J.C. (1994). Sorting and processing of secretory proteins. Biochem. J. *299*, 1–18.

Hammond, S.M., Altshuller, Y.M., Sung, T.C., Rudge, S.A., Rose, K., Engebrecht, J.A.,

Morris, A.J., and Frohman, M.A. (1995). Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family. J. Biol. Chem. *270*, 29640–29643.

Hammond, S.M., Jenco, J.M., Nakashima, S., Cadwallader, K., Gu, Q.M., Cook, S., Nozawa, Y., Prestwich, G.D., Frohman, M.A., and Morris, A.J. (1997). Characterization of two alternately spliced forms of phospholipase D1: Activation of the purified enzymes by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, ADP-ribosylation factor, and RHO family monomeric GTP-binding proteins and protein kinase C-α. J. Biol. Chem. *272*, 3860–3868.

Harata, N.C., Aravanis, A.M., and Tsien, R.W. (2006). Kiss-and-run and full-collapse fusion as modes of exo-endocytosis in neurosecretion. J. Neurochem. *97*, 1546–1570.

Hata, Y., Slaughter, C.A., and Südhof, T.C. (1993). Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. Nature *366*, 347–351.

He, Z., Fan, J., Kang, L., Lu, J., Xue, Y., Xu, P., Xu, T., and Chen, L. (2008). Ca2+ triggers a novel clathrin-independent but actin-dependent fast endocytosis in pancreatic beta cells. Traffic *9*, 910–923.

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.

Heider, M.R., and Munson, M. (2012). Exorcising the exocyst complex. Traffic *13*, 898–907.

Helle, K.B. (2004). The granin family of uniquely acidic proteins of the diffuse neuroendocrine system: Comparative and functional aspects. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. *79*, 769–794.

Helle, K.B., Marley, P.D., Angeletti, R.H., Aunis, D., Galindo, E., Small, D.H., and Livett, B.G. (1993). Chromogranin A: Secretion of Processed Products from the Stimulated Retrogradely Perfused Bovine Adrenal Gland. J. Neuroendocrinol. *5*, 413–420.

Henkels, K.M., Miller, T.E., Ganesan, R., Wilkins, B.A., Fite, K., and Gomez-Cambronero, J. (2016). A Phosphatidic Acid (PA) conveyor system of continuous intracellular transport from cell membrane to nucleus maintains EGF receptor homeostasis. Oncotarget *7*.

Henneberry, A.L., Wright, M.M., and McMaster, C.R. (2002). The major sites of cellular phospholipid synthesis and molecular determinants of fatty acid and lipid head group specificity. Mol. Biol. Cell *13*, 3148–3161.

Herate, C., Ramdani, G., Grant, N.J., Marion, S., Gasman, S., Niedergang, F., Benichou, S., and Bouchet, J. (2016). Phospholipid scramblase 1 modulates FcR-mediated phagocytosis in differentiated macrophages. PLoS One *11*.

Hillarp, N.A. (1958). Isolation and some biochemical properties of the catechol amine granules in the cow adrenal medulla. Acta Physiol. Scand. *43*, 82–96.

Hinners, I., Wendler, F., Fei, H., Thomas, L., Thomas, G., and Tooze, S.A. (2003). AP-1

recruitment to VAMP4 is modulated by phosphorylation-dependent binding of PACS-1. EMBO Rep. *4*, 1182–1189.

Höer, A., Cetindag, C., and Oberdisse, E. (2000). Influence of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on human phospholipase D1 wild-type and deletion mutants: Is there evidence for an interaction of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate with the putative Pleckstrin homology domain? Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol. *1481*, 189–201.

Hofbauer, H.F., Gecht, M., Fischer, S.C., Seybert, A., Frangakis, A.S., Stelzer, E.H.K., Covino, R., Hummer, G., and Ernst, R. (2018). The molecular recognition of phosphatidic acid by an amphipathic helix in Opi1. J. Cell Biol. *217*, 3109–3126.

Hollenback, D., Bonham, L., Law, L., Rossnagle, E., Romero, L., Carew, H., Tompkins, C.K., Leung, D.W., Singer, J.W., White, T., et al. (2006). Substrate specificity of lysophosphatidic acid acyltransferase b-evidence from membrane and whole cell assays. J. Lipid Res. *47*.

Holst, B., Madsen, K.L., Jansen, A.M., Jin, C., Rickhag, M., Lund, V.K., Jensen, M., Bhatia, V., Sørensen, G., Madsen, A.N., et al. (2013). PICK1 Deficiency Impairs Secretory Vesicle Biogenesis and Leads to Growth Retardation and Decreased Glucose Tolerance. PLoS Biol. *11*.

Honda, A., Nogami, M., Yokozeki, T., Yamazaki, M., Nakamura, H., Watanabe, H., Kawamoto, K., Nakayama, K., Morris, A.J., Frohman, M.A., et al. (1999). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase α is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. Cell *99*, 521–532.

Honig, M.G., and Hume, R.I. (1986). Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures. J. Cell Biol. *103*, 171–187.

Horchani, H., De Saint-Jean, M., Barelli, H.L., and Antonny, B. (2014). Interaction of the Spo20 membrane-sensor motif with phosphatidic acid and other anionic lipids, and influence of the membrane environment. PLoS One *9*.

Hosaka, M., Watanabe, T., Sakai, Y., Uchiyama, Y., and Takeuchi, T. (2002). Identification of a chromogranin A domain that mediates binding to secretogranin III and targeting to secretory granules in pituitary cells and pancreatic beta-cells. Mol. Biol. Cell *13*, 3388–3399.

Hosaka, M., Suda, M., Sakai, Y., Izumi, T., Watanabe, T., and Takeuchi, T. (2004). Secretogranin III binds to cholesterol in the secretory granule membrane as an adapter for chromogranin A. J. Biol. Chem. *279*, 3627–3634.

Hosaka, M., Watanabe, T., Sakai, Y., Kato, T., and Takeuchi, T. (2005). Interaction between secretogranin III and carboxypeptidase E facilitates prohormone sorting within secretory granules. J. Cell Sci. *118*, 4785–4795.

Hosoi, N., Holt, M., and Sakaba, T. (2009). Calcium dependence of exo- and endocytotic coupling at a glutamatergic synapse. Neuron *63*, 216–229.

Houy, S., Croisé, P., Gubar, O., Chasserot-golaz, S., Tryoen-tóth, P., Bailly, Y., Ory, S., Bader, M., and Gasman, S. (2013). Exocytosis and endocytosis in neuroendocrine cells : inseparable membranes ! *4*, 1–7.

Houy, S., Estay-Ahumada, C., Croisé, P., Calco, V., Haeberlé, A.M., Bailly, Y., Billuart, P., Vitale, N., Bader, M.F., Ory, S., et al. (2015). Oligophrenin-1 connects exocytotic fusion to compensatory endocytosis in neuroendocrine cells. J. Neurosci. *35*, 11045–11055.

Hsu, S.C., Hazuka, C.D., Foletti, D.L., and Scheller, R.H. (1999). Targeting vesicles to specific sites on the plasma membrane: The role of the sec6/8 complex. Trends Cell Biol. *9*, 150–153.

Hsu, S.C., TerBush, D., Abraham, M., and Guo, W. (2004). The Exocyst Complex in Polarized Exocytosis. Int. Rev. Cytol. *233*, 243–265.

Huet, S., Fanget, I., Jouannot, O., Meireles, P., Zeiske, T., Larochette, N., Darchen, F., and Desnos, C. (2012). Myrip couples the capture of secretory granules by the actin-rich cell cortex and their attachment to the plasma membrane. J. Neurosci. *32*, 2564–2577.

Hummer, B.H., Maslar, D., Soltero-Gutierrez, M., de Leeuw, N.F., and Asensio, C.S. (2020). Differential sorting behavior for soluble and transmembrane cargoes at the trans-Golgi network in endocrine cells. Mol. Biol. Cell *31*, 157–166.

Huston, E., Gall, I., Houslay, T.M., and Houslay, M.D. (2006). Helix-1 of the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4A1 regulates its phospholipase-D-dependent redistribution in response to release of Ca2+. J. Cell Sci. *119*, 3799–3810.

~ I ~

Iacangelo, A.L., Grimes, M., and Eiden, L.E. (1991). The bovine chromogranin A gene: structural basis for hormone regulation and generation of biologically active peptides. Mol. Endocrinol. *5*, 1651–1660.

Ikeda, M., Kihara, A., and Igarashi, Y. (2006). Lipid asymmetry of the eukaryotic plasma membrane: Functions and related enzymes. Biol. Pharm. Bull. *29*, 1542–1546.

~ J ~

Jackson, J., Papadopulos, A., Meunier, F.A., McCluskey, A., Robinson, P.J., and Keating, D.J. (2015). Small molecules demonstrate the role of dynamin as a bi-directional regulator of the exocytosis fusion pore and vesicle release. Mol. Psychiatry *20*, 810–819.

Jackson, M.B., Chapman E.R. (2008). The fusion pores of Ca2+ -triggered exocytosis. Nat Struct Mol Biol. *15*, 684–689.

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

Jang, J.H., Lee, C.S., Hwang, D., and Ryu, S.H. (2012). Understanding of the roles of

phospholipase D and phosphatidic acid through their binding partners. Prog. Lipid Res. *51*, 71–81.

Jefferies, K.C., Cipriano, D.J., and Forgac, M. (2008). Function, structure and regulation of the vacuolar (H+)-ATPases. Arch. Biochem. Biophys. *476*, 33–42.

Johannes, L., Doussau, F., Clabecq, A., Henry, J.P., Darchen, F., and Poulain, B. (1996). Evidence for a functional link between Rab3 and the SNARE complex. J. Cell Sci. *109 (Pt 12)*, 2875–2884.

Johnson, R.G. (1988). Accumulation of biological amines into chromaffin granules: a model for hormone and neurotransmitter transport. Physiol. Rev. *68*, 232–307.

Jones, D., Morgan, C., and Cockcroft, S. (1999). Phospholipase D and membrane traffic. Potential roles in regulated exocytosis, membrane delivery and vesicle budding. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids *1439*, 229–244.

Jones, D.H., Morris, J.B., Morgan, C.P., Kondo, H., Irvine, R.F., and Cockcroft, S. (2000). Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase directly interacts with ADP-ribosylation factor 1 and is responsible for phosphatidylinositol 4,5- bisphosphate synthesis in the Golgi compartment. J. Biol. Chem. *275*, 13962–13966.

Jørgensen, I.L., Kemmer, G.C., and Pomorski, T.G. (2017). Membrane protein reconstitution into giant unilamellar vesicles: a review on current techniques. Eur. Biophys. J. *46*, 103–119.

~ K ~

Kadamur, G., and Ross, E.M. (2013). Mammalian Phospholipase C.

Kaether, C., Salm, T., Glombik, M., Almers, W., and Gerdes, H.H. (1997). Targeting of green fluorescent protein to neuroendocrine secretory granules: a new tool for real time studies of regulated protein secretion. Eur. J. Cell Biol. *74*, 133–142.

Kanaho, Y., Funakoshi, Y., and Hasegawa, H. (2009). Phospholipase D signalling and its involvement in neurite outgrowth. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids *1791*, 898–904.

Kang, Y.K., and Yoo, S.H. (1997). Identification of the secretory vesicle membrane binding region of chromogranin A. FEBS Lett. *404*, 87–90.

Kang, D.W., Choi, C.Y., Cho, Y.-H., Tian, H., Di Paolo, G., Choi, K.-Y., and Min, D.S. (2015). Targeting phospholipase D1 attenuates intestinal tumorigenesis by controlling β-catenin signaling in cancer-initiating cells. J. Exp. Med. *212*, 1219–1237.

Kassas, N., Tryoen-Tóth, P., Corrotte, M., Thahouly, T., Bader, M.-F., Grant, N.J., and Vitale, N. (2012). Genetically encoded probes for phosphatidic acid. Methods Cell Biol. *108*, 445–459.

Kassas, N., Tanguy, E., Thahouly, T., Fouillen, L., Heintz, D., Chasserot-Golaz, S., Bader,

M.F., Grant, N.J., and Vitale, N. (2017). Comparative characterization of phosphatidic acid sensors and their localization during frustrated phagocytosis. J. Biol. Chem. *292*, 4266–4279.

Kelly, R.B. (1985). Pathways of protein secretion in eukaryotes. Science *230*, 25–32.

Khanna, R., Li, Q., Schlichter, L.C., and Stanley, E.F. (2007). The transmitter release-site CaV2.2 channel cluster is linked to an endocytosis coat protein complex. Eur. J. Neurosci. *26*, 560–574.

Kim, T., Gondré-Lewis, M.C., Arnaoutova, I., and Loh, Y.P. (2006). Dense-Core Secretory Granule Biogenesis. Physiology *21*, 124–133.

Kim, Y., Kim, J.E., Lee, S. Do, Lee, T.G., Kim, J.H., Park, J.B., Han, J.M., Jang, S.K., Suh, P.G., and Ryu, S.H. (1999). Phospholipase D1 is located and activated by protein kinase Cα in the plasma membrane in 3Y1 fibroblast cell. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids *1436*, 319–330.

Klenchin, V.A., and Martin, T.F.J. (2000). Priming in exocytosis: Attaining fusion-competence after vesicle docking. Biochimie *82*, 399–407.

Klumperman, J., Kuliawat, R., Griffith, J.M., Geuze, H.J., and Arvan, P. (1998). Mannose 6-phosphate receptors are sorted from immature secretory granules via adaptor protein AP-1, clathrin, and syntaxin 6-positive vesicles. J. Cell Biol. *141*, 359–371.

Koch, M., and Holt, M. (2012). Coupling exo- and endocytosis: An essential role for PIP2 at the synapse. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids *1821*, 1114–1132.

Kögel, T., Gerdes, H.H. Maturation of secretory granules. (2010). Results Probl Cell Differ. *50*, 1–20.

Konecki, D.S., Benedum, U.M., Gerdes, H.H., and Huttner, W.B. (1987). The primary structure of human chromogranin A and pancreastatin. J. Biol. Chem. *262*, 17026–17030.

Kooijman, E.E., Chupin, V., de Kruijff, B., and Burger, K.N.J. (2003). Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. Traffic *4*, 162–174.

Kooijman, E.E., Chupin, V., Fuller, N.L., Kozlov, M.M., De Kruijff, B., Burger, K.N.J., and Rand, P.R. (2005). Spontaneous curvature of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. Biochemistry *44*, 2097–2102.

Kooijman, E.E., Tieleman, D.P., Testerink, C., Munnik, T., Rijkers, D.T.S., Burger, K.N.J., and De Kruijff, B. (2007). An electrostatic/hydrogen bond switch as the basis for the specific interaction of phosphatidic acid with proteins. J. Biol. Chem. *282*, 11356–11364.

Kostron, H., Winkler, H., Geissler, D., and König, P. (1977). Uptake of calcium by chromaffin granules in vitro. J. Neurochem. *28*, 487–493.

Krantz, D.E., Peter, D., Liu, Y., and Edwards, R.H. (1997). Phosphorylation of a vesicular monoamine transporter by casein kinase II. J. Biol. Chem. *272*, 6752–6759.

Krantz, D.E., Waites, C., Oorschot, V., Liu, Y., Wilson, R.I., Tan, P.K., Klumperman, J., and Edwards, R.H. (2000). A phosphorylation site regulates sorting of the vesicular acetylcholine

transporter to dense core vesicles. J. Cell Biol. *149*, 379–396.

Krieger-Brauer, H., and Gratzl, M. (1982). Uptake of Ca2+ by isolated secretory vesicles from adrenal medulla. Biochim. Biophys. Acta *691*, 61–70.

Ktistakis, N.T., Brown, H.A., Sternweis, P.C., and Roth, M.G. (1995). Phospholipase D is present on Golgi-enriched membranes and its activation by ADP ribosylation factor is sensitive to brefeldin A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *92*, 4952–4956.

Ktistakis, N.T., Brown, H.A., Waters, M.G., Sternweis, P.C., and Roth, M.G. (1996). Evidence that phospholipase D mediates ADP ribosylation factor-dependent formation of Golgi coated vesicles. J. Cell Biol. *134*, 295–306.

Kuliawat, R., and Arvan, P. (1994). Distinct molecular mechanisms for protein sorting within immature secretory granules of pancreatic β-cells. J. Cell Biol. *126*, 77–86.

Kuliawat, R., Klumperman, J., Ludwig, T., and Arvan, P. (1997). Differential sorting of lysosomal enzymes out of the regulated secretory pathway in pancreatic β-cells. J. Cell Biol. *137*, 595–608.

~ L ~

Lansbergen, G., Grigoriev, I., Mimori-Kiyosue, Y., Ohtsuka, T., Higa, S., Kitajima, I., Demmers, J., Galjart, N., Houtsmuller, A.B., Grosveld, F., et al. (2006). CLASPs attach microtubule plus ends to the cell cortex through a complex with LL5beta. Dev. Cell *11*, 21–32.

Lee, D.S., Hirashima, N., and Kirino, Y. (2000). Rapid transbilayer phospholipid redistribution associated with exocytotic release of neurotransmitters from cholinergic nerve terminals isolated from electric ray Narke japonica. Neurosci. Lett. *291*, 21–24.

Leung, D.W. (2001). The structure and functions of human lysophosphatidic acid acyltransferases. Front. Biosci. *6*.

Liang, K., Wei, L., and Chen, L. (2017). Exocytosis, endocytosis, and their coupling in excitable cells. Front. Mol. Neurosci. *10*, 1–10.

Liao, M.J., and Prestegard, J.H. (1981). Structural properties of a Ca2+-phosphatidic acid complex Small angle x-ray scattering and calorimetric results. BBA - Biomembr. *645*, 149–156.

Lipsky, N.G., and Pagano, R.E. (1985). A vital stain for the Golgi apparatus. Science (80-.). *228*, 745–747.

Lira, R.B., Dimova, R., and Riske, K.A. (2014). Giant unilamellar vesicles formed by hybrid films of agarose and lipids display altered mechanical properties. Biophys. J. *107*, 1609–1619.

Liscovitch, M., Czarny, M., Fiucci, G., Lavie, Y., and Tang, X. (1999). Localization and possible functions of phospholipase D isozymes. Biochim. Biophys. Acta *1439*, 245–263.

Llinás, R., Sugimori, M., and Silver, R.B. (1992). Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. Science (80-.). *256*, 677–679.

Loew, S., Kooijman, E.E., and May, S. (2013). Increased pH-sensitivity of protein binding

to lipid membranes through the electrostatic-hydrogen bond switch. Chem. Phys. Lipids *169*, 9–18.

Loewen, C.J.R., Gazpar, M.L., Jesch, S.A., Delon, C., Ktistakis, N.T., Henry, S.A., and Levine, T.P. (2004). Phospholipid metabolism regulated by a transcription factor sensing phosphatidic acid. Science (80-.). *304*, 1644–1647.

Loh, Y.P., Maldonado, A., Zhang, C., Tam, W.H., and Cawley, N. (2002). Mechanism of sorting proopiomelanocortin and proenkephalin to the regulated secretory pathway of neuroendocrine cells. In Annals of the New York Academy of Sciences, (New York Academy of Sciences), pp. 416–425.

Lou, H., Kim, S.-K., Zaitsev, E., Snell, C.R., Lu, B., and Loh, Y.P. (2005). Sorting and activity-dependent secretion of BDNF require interaction of a specific motif with the sorting receptor carboxypeptidase e. Neuron *45*, 245–255.

Lou, H., Park, J.J., Cawley, N.X., Sarcon, A., Sun, L., Adams, T., and Peng Loh, Y. (2010). Carboxypeptidase e cytoplasmic tail mediates localization of synaptic vesicles to the pre-active zone in hypothalamic pre-synaptic terminals. J. Neurochem. *114*, 886–896.

Lou, H., Park, J.J., Phillips, A., and Loh, Y.P. (2013). γ-Adducin promotes process outgrowth and secretory protein exit from the golgi apparatus. J. Mol. Neurosci. *49*, 1–10.

Lou, X., Paradise, S., Ferguson, S.M., and De Camilli, P. (2008). Selective saturation of slow endocytosis at a giant glutamatergic central synapse lacking dynamin 1. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 17555–17560.

Lundmark, R., Doherty, G.J., Vallis, Y., Peter, B.J., and McMahon, H.T. (2008). Arf family GTP loading is activated by, and generates, positive membrane curvature. Biochem. J. *414*, 189–194.

~ M ~

Ma, C., Li, W., Xu, Y., and Rizo, J. (2011). Munc13 mediates the transition from the closed syntaxin-Munc18 complex to the SNARE complex. Nat. Struct. Mol. Biol. *18*, 542–549.

Machado, J.D., Díaz-Vera, J., Domínguez, N., Alvarez, C.M., Pardo, M.R., and Borges, R. (2010). Chromogranins A and B as regulators of vesicle cargo and exocytosis. Cell. Mol. Neurobiol. *30*, 1181–1187.

Machen, T.E., Leigh, M.J., Taylor, C., Kimura, T., Asano, S., and Moore, H.-P.H. (2003). pH of TGN and recycling endosomes of H+/K+-ATPase-transfected HEK-293 cells: implications for pH regulation in the secretory pathway. Am. J. Physiol. Cell Physiol. *285*, C205-14.

Mahapatra, S., and Lou, X. (2017). Dynamin-1 deletion enhances post-tetanic potentiation and quantal size after tetanic stimulation at the calyx of Held. J. Physiol. *595*, 193–206.

Mahapatra, N.R., Mahata, M., O'Connor, D.T., and Mahata, S.K. (2003). Secretin

activation of chromogranin A gene transcription. Identification of the signaling pathways in cis and in trans. J. Biol. Chem. *278*, 19986–19994.

Mahapatra, S., Fan, F., and Lou, X. (2016). Tissue-specific dynamin-1 deletion at the calyx of Held decreases short-term depression through a mechanism distinct from vesicle resupply. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *113*, E3150-8.

Mahata, S.K., and Corti, A. (2019). Chromogranin a and its fragments in cardiovascular, immunometabolic, and cancer regulation. In Annals of the New York Academy of Sciences, (Blackwell Publishing Inc.), pp. 34–58.

Mahata, S.K., O'Connor, D.T., Mahata, M., Yoo, S.H., Taupenot, L., Wu, H., Gill, B.M., and Parmer, R.J. (1997). Novel autocrine feedback control of catecholamine release. A discrete chromogranin a fragment is a noncompetitive nicotinic cholinergic antagonist. J. Clin. Invest. *100*, 1623–1633.

Mahata, S.K., Mahapatra, N.R., Mahata, M., and O'Connor, D.T. (2002). Neuroendocrine cell type-specific and inducible expression of chromogranin/secretogranin genes: Crucial promoter motifs. In Annals of the New York Academy of Sciences, (New York Academy of Sciences), pp. 27–38.

Makowski, S.L., Tran, T.T., and Field, S.J. (2017). Emerging themes of regulation at the Golgi. Curr. Opin. Cell Biol. *45*, 17–23.

Malacombe, M., Ceridono, M., Calco, V., Chasserot-Golaz, S., McPherson, P.S., Bader, M.-F., and Gasman, S. (2006). Intersectin-1L nucleotide exchange factor regulates secretory granule exocytosis by activating Cdc42. EMBO J. *25*, 3494–3503.

Malosio, M.L., Giordano, T., Laslop, A., and Meldolesi, J. (2004). Dense-core granules: A specific hallmark of the neuronal/neurosecretory cell phenotype. J. Cell Sci. *117*, 743–749.

Manifava, M., Thuring, J.W.J.F., Lim, Z.Y., Packman, L., Holmes, A.B., and Ktistakis, N.T. (2001). Differential Binding of Traffic-related Proteins to Phosphatidic Acid- or Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphate-coupled Affinity Reagents. J. Biol. Chem. *276*, 8987–8994.

Manno, S., Takakuwa, Y., and Mohandas, N. (2002). Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 1943–1948.

Martin, T.F.J. (2015). Role of PI(4,5)P2 in vesicle exocytosis and membrane fusion. Subcell. Biochem. *59*, 111–130.

De Matteis, M.A., and Luini, A. (2008). Exiting the Golgi complex. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *9*, 273–284.

Mayer, A. (2002). Membrane fusion in eukaryotic cells. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *18*, 289–314.

McAdam, R.L., Varga, K.T., Jiang, Z., Young, F.B., Blandford, V., McPherson, P.S., Gong,

L.W., and Sossin, W.S. (2015). The juxtamembrane region of synaptotagmin 1 interacts with dynamin 1 and regulates vesicle fission during compensatory endocytosis in endocrine cells. J. Cell Sci. *128*, 2229–2235.

McIntosh, T.J. (1996). Hydration properties of lamellar and non-lamellar phases of phosphatidylcholine and phospatidylethanolamine. Chem. Phys. Lipids *81*, 117–131.

van Meer, G. (1998). Lipids of the Golgi membrane. Trends Cell Biol. *8*, 29–33.

van Meer, G., and de Kroon, A.I.P.M. (2011). Lipid map of the mammalian cell. J. Cell Sci. *124*, 5–8.

van Meer, G., Voelker, D.R., and Feigenson, G.W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *9*, 112–124.

Van Meer, G., and Sprong, H. (2004). Membrane lipids and vesicular traffic. Curr. Opin. Cell Biol. *16*, 373–378.

Meldolesi, J., Chieregatti, E., and Malosio, M.L. (2004). Requirements for the identification of dense-core granules. Trends Cell Biol. *14*, 13–19.

Metz-Boutigue, M., Garcia-Sablone, P., Hogue-Angeletti, R., and Aunis, D. (1993). Intracellular and extracellular processing of chromogranin A: Determination of cleavage sites. Eur. J. Biochem. *217*, 247–257.

Milgram, S.L., Mains, R.E., and Eipper, B.A. (1996). Identification of routing determinants in the cytosolic domain of a secretory granule-associated integral membrane protein. J. Biol. Chem. *271*, 17526–17535.

Mills, I.G., Praefcke, G.J.K., Vallis, Y., Peter, B.J., Olesen, L.E., Gallop, J.L., Butler, P.J.G., Evans, P.R., and McMahon, H.T. (2003). Epsinr: An AP1/clathrin interacting protein involved in vesicle trafficking. J. Cell Biol. *160*, 213–222.

Miserey-Lenkei, S., Chalancon, G., Bardin, S., Formstecher, E., Goud, B., and Echard, A. (2010). Rab and actomyosin-dependent fission of transport vesicles at the golgi complex. Nat. Cell Biol. *12*, 645–654.

Monkawa, T., Miyawaki, A., Sugiyama, T., Yoneshima, H., Yamamoto-Hino, M., Furuichi, T., Saruta, T., Hasegawa, M., and Mikoshiba, K. (1995). Heterotetrameric complex formation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subunits. J. Biol. Chem. *270*, 14700–14704.

Montero-Hadjadje, M., Vaudry, H., Turquier, V., Leprince, J., Do Rego, J.L., Yon, L., Gallo-Payet, N., Plouin, P.F., and Anouar, Y. (2002). Localization and characterization of evolutionarily conserved chromogranin A-derived peptides in the rat and human pituitary and adrenal glands. Cell Tissue Res. *310*, 223–236.

Montero-Hadjadje, M., Vaingankar, S., Elias, S., Tostivint, H., Mahata, S.K., and Anouar, Y. (2008). Chromogranins A and B and secretogranin II: evolutionary and functional aspects. Acta Physiol. (Oxf). *192*, 309–324.

Montero-Hadjadje, M., Elias, S., Chevalier, L., Benard, M., Tanguy, Y., Turquier, V., Galas,

L., Yon, L., Malagon, M.M., Driouich, A., et al. (2009). Chromogranin A promotes peptide hormone sorting to mobile granules in constitutively and regulated secreting cells. Role of conserved N- and C-terminal peptides. J. Biol. Chem. *284*, 12420–12431.

Moore H.P. (1987). Factors Controlling Packaging of Peptide Hormones into Secretory Granules. Ann. N. Y. Acad. Sci. *493*, 50–61.

Mosley, C.A., Taupenot, L., Biswas, N., Taulane, J.P., Olson, N.H., Vaingankar, S.M., Wen, G., Schork, N.J., Ziegler, M.G., Mahata, S.K., et al. (2007). Biogenesis of the secretory granule: Chromogranin A coiled-coil structure results in unusual physical properties and suggests a mechanism for granule core condensation. Biochemistry *46*, 10999–11012.

Mulcahy, L.R., Barker, A.J., and Nillni, E.A. (2006). Disruption of disulfide bond formation alters the trafficking of prothyrotropin releasing hormone (proTRH)-derived peptides. Regul. Pept. *133*, 123–133.

~ N ~

Nakanishi, H., De Los Santos, P., and Neiman, A.M. (2004). Positive and Negative Regulation of a SNARE Protein by Control of Intracellular Localization. Mol. Biol. Cell *15*, 1802–1815.

Nakano-Kobayashi, A., Tai, Y., Nadif Kasri, N., and Van Aelst, L. (2014). The X-linked mental retardation protein OPHN1 interacts with Homer1b/c to control spine endocytic zone positioning and expression of synaptic potentiation. J. Neurosci. *34*, 8665–8671.

Nakata, T., and Hirokawa, N. (1992). Organization of cortical cytoskeleton of cultured chromaffin cells and involvement in secretion as revealed by quick-freeze, deep-etching, and double-label immunoelectron microscopy. J. Neurosci. *12*, 2186–2197.

Narayan, K., and Lemmon, M.A. (2006). Determining selectivity of phosphoinositide-binding domains. Methods *39*, 122–133.

Neco, P., Giner, D., del Mar Francés, M., Viniegra, S., and Gutiérrez, L.M. (2003). Differential participation of actin- and tubulin-based vesicle transport systems during secretion in bovine chromaffin cells. Eur. J. Neurosci. *18*, 733–742.

Nicaise, G., Maggio, K., Thirion, S., Horoyan, M., and Keicher, E. (1992). The calcium loading of secretory granules. A possible key event in stimulus-secretion coupling. Biol. Cell *75*, 89–99.

~ O ~

O'Bryan, J.P. (2010). Intersecting pathways in cell biology. Sci. Signal. *3*, re10.

O'Connor, D.T., Mahata, S.K., Mahata, M., Jiang, Q., Hook, V.Y., and Taupenot, L. (2007). Primary culture of bovine chromaffin cells. Nat. Protoc. *2*, 1248–1253.

O'Luanaigh, N., Pardo, R., Fensome, A., Allen-Baume, V., Jones, D., Holt, M.R., and Cockcroft, S. (2002). Continual production of phosphatidic acid by phospholipase D is essential

for antigen-stimulated membrane ruffling in cultured mast cells. Mol. Biol. Cell *13*, 3730–3746.

Opazo, F., and Rizzoli, S.O. (2010). The fate of synaptic vesicle components upon fusion. Commun. Integr. Biol. *3*, 427–429.

Opazo, F., Punge, A., Hell, S.W., and Rizzoli, S.O. (2010). Limited Intermixing of Synaptic Vesicle Components upon Vesicle Recycling. 800–812.

Orci, L. (1986). The insulin cell: Its cellular environment and how it processes (Pro)insulin. Diabetes. Metab. Rev. *2*, 71–106.

Orci, L., and Malaisse, W. (1980). Hypothesis: single and chain release of insulin secretory granules is related to anionic transport at exocytotic sites. Diabetes *29*, 943–944.

Orci, L., Miller, R.G., Montesano, R., Perrelet, A., Amherdt, M., and Vassalli, P. (1980). Opposite polarity of filipin-induced deformations in the membrane of condensing vacuoles and zymogen granules. Science *210*, 1019–1021.

Orci, L., Montesano, R., Meda, P., Malaisse-Lagae, F., Brown, D., Perrelet, A., and Vassalli, P. (1981). Heterogeneous distribution of filipin-cholesterol complexes across the cisternae of the Golgi apparatus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *78*, 293–297.

Orci, L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Powell, S.K., Quinn, D.L., and Moore, H.-P.H. (1987). The trans-most cisternae of the Golgi complex: A compartment for sorting of secretory and plasma membrane proteins. Cell *51*, 1039–1051.

Ory, S., Ceridono, M., Momboisse, F., Houy, S., Chasserot-Golaz, S., Heintz, D., Calco, V., Haeberlé, A.-M., Espinoza, F.A., Sims, P.J., et al. (2013). Phospholipid scramblase-1-induced lipid reorganization regulates compensatory endocytosis in neuroendocrine cells. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *33*, 3545–3556.

Osisami, M., Ali, W., and Frohman, M.A. (2012). A role for phospholipase D3 in myotube formation. PLoS One *7*, e33341.

~ P ~

Pagano, R.E., Martin, O.C., Kang, H.C., and Haugland, R.P. (1991). A novel fluorescent ceramide analogue for studying membrane traffic in animal cells: Accumulation at the Golgi apparatus results in altered spectral properties of the sphingolipid precursor. J. Cell Biol. *113*, 1267–1279.

Park, J.J., and Loh, Y.P. (2008). How peptide hormone vesicles are transported to the secretion site for exocytosis. Mol. Endocrinol. *22*, 2583–2595.

Park, J.J., Cawley, N.X., and Loh, Y.P. (2008). A bi-directional carboxypeptidase E-driven transport mechanism controls BDNF vesicle homeostasis in hippocampal neurons. Mol. Cell. Neurosci. *39*, 63–73.

Parmer, R.J., Mahata, M., Gong, Y., Mahata, S.K., Jiang, Q., O'Connor, D.T., Xi, X.P., and Miles, L.A. (2000). Processing of chromogranin A by plasmin provides a novel mechanism for

regulating catecholamine secretion. J. Clin. Invest. *106*, 907–915.

Pasqua, T., Mahata, S., Bandyopadhyay, G.K., Biswas, A., Perkins, G.A., Sinha-Hikim, A.P., Goldstein, D.S., Eiden, L.E., and Mahata, S.K. (2016). Impact of Chromogranin A deficiency on catecholamine storage, catecholamine granule morphology and chromaffin cell energy metabolism in vivo. Cell Tissue Res. *363*, 693–712.

Patel, S., and Docampo, R. (2010). Acidic calcium stores open for business: expanding the potential for intracellular Ca2+ signaling. Trends Cell Biol. *20*, 277–286.

Patel, S., and Muallem, S. (2011). Acidic Ca2+ stores come to the fore. Cell Calcium *50*, 109–112.

Patzak, A., and Winkler, H. (1986). Exocytotic exposure and recycling of membrane antigens of chromaffin granules: ultrastructural evaluation after immunolabeling. J. Cell Biol. *102*, 510–515.

Patzak, A., Aunis, D., and Langley, K. (1987). Membrane recycling after exocytosis: An ultrastructural study of cultured chromaffin cells. Exp. Cell Res. *171*, 346–356.

Peng, X., and Frohman, M.A. (2012). Mammalian phospholipase D physiological and pathological roles. Acta Physiol. *204*, 219–226.

Peters, C., Bayer, M.J., Bühler, S., Andersen, J.S., Mann, M., and Mayer, A. (2001). Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. Nature *409*, 581–588.

Phillips, J.H., Burridge, K., Wilson, S.P., and Kirshner, N. (1983). Visualization of the exocytosis/endocytosis secretory cycle in cultured adrenal chromaffin cells. J. Cell Biol. *97*, 1906–1917.

Pimplikar, S.W., and Huttner, W.B. (1992). Chromogranin B (secretogranin I), a secretory protein of the regulated pathway, is also present in a tightly membrane-associated form in PC12 cells. J. Biol. Chem. *267*, 4110–4118.

Pittman, J.K. (2011). Vacuolar Ca(2+) uptake. Cell Calcium *50*, 139–146.

Pleskot, R., Li, J., Žárský, V., Potocký, M., and Staiger, C.J. (2013). Regulation of cytoskeletal dynamics by phospholipase D and phosphatidic acid. Trends Plant Sci. *18*, 496–504.

Pomorski, T., and Menon, A.K. (2006). Lipid flippases and their biological functions. Cell. Mol. Life Sci. *63*, 2908–2921.

Potocký, M., Pleskot, R., Pejchar, P., Vitale, N., Kost, B., and Žárský, V. (2014). Live-cell imaging of phosphatidic acid dynamics in pollen tubes visualized by Spo20p-derived biosensor. New Phytol. *203*, 483–494.

Putta, P., Rankenberg, J., Korver, R.A., van Wijk, R., Munnik, T., Testerink, C., and Kooijman, E.E. (2016). Phosphatidic acid binding proteins display differential binding as a function of membrane curvature stress and chemical properties. Biochim. Biophys. Acta -

Biomembr. *1858*, 2709–2716.

~ R ~

Rahajeng, J., Kuna, R.S., Makowski, S.L., Tran, T.T.T., Buschman, M.D., Li, S., Cheng, N., Ng, M.M., and Field, S.J. (2019). Efficient Golgi Forward Trafficking Requires GOLPH3-Driven, PI4P-Dependent Membrane Curvature. Dev. Cell *50*, 573-585.e5.

Raja, M., Spelbrink, R.E.J., de Kruijff, B., and Killian, J.A. (2007). Phosphatidic acid plays a special role in stabilizing and folding of the tetrameric potassium channel KcsA. FEBS Lett. *581*, 5715–5722.

Raucher, D., Stauffer, T., Chen, W., Shen, K., Guo, S., York, J.D., Sheetz, M.P., and Meyer, T. (2000). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion. Cell *100*, 221–228.

Ribbes, G., Henry, J., Cariven, C., Pontarotti, P., Chap, H., and Record, M. (1996). Expressed sequence tags identify human isologs of the ARF-Dependent phospholipase D. Biochem. Biophys. Res. Commun. *224*, 206–211.

Rindler, M.J. (1998). Carboxypeptidase E, a Peripheral Membrane Protein Implicated in the Targeting of Hormones to Secretory Granules, Co-aggregates with Granule Content Proteins at Acidic pH. J. Biol. Chem. *273*, 31180–31185.

Rizo, J, Südhof, T.C. (2002). Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. Nat Rev Neurosci. *3*, 641–653.

Rizo, J., and Südhof, T.C. (2012). The membrane fusion enigma: SNAREs, Sec1/Munc18 proteins, and their accomplices--guilty as charged? Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *28*, 279–308.

Rizo, J., and Xu, J. (2015). The Synaptic Vesicle Release Machinery. Annu. Rev. Biophys. *44*, 339–367.

Rizzo, M., and Romero, G. (2002). Pharmacological importance of phospholipase D and phosphatidic acid in the regulation of the mitogen-activated protein kinase cascade. Pharmacol. Ther. *94*, 35–50.

Rizzoli, S.O., and Jahn, R. (2007). Kiss-and-run, collapse and “readily retrievable” vesicles. Traffic *8*, 1137–1144.

Roos, J., and Kelly, R.B. (1998). Dap160, a neural-specific Eps15 homology and multiple SH3 domain-containing protein that interacts with Drosophila dynamin. J. Biol. Chem. *273*, 19108–19119.

Rosado, J.A. (2011). Acidic Ca2+ stores in platelets. Cell Calcium *50*, 168–174.

Rose, S., Malabarba, M.G., Krag, C., Schultz, A., Tsushima, H., Di Fiore, P.P., and Salcini, A.E. (2007). Caenorhabditis elegans intersectin: A synaptic protein regulating neurotransmission. Mol. Biol. Cell *18*, 5091–5099.

Rosé, S.D., Lejen, T., Casaletti, L., Larson, R.E., Pene, T.D., and Trifaró, J.-M. (2003).

Myosins II and V in chromaffin cells: myosin V is a chromaffin vesicle molecular motor involved in secretion. J. Neurochem. *85*, 287–298.

Roth, M.G. (1999). Lipid regulators of membrane traffic through the Golgi complex. Trends Cell Biol. *9*, 174–179.

Roth, M.G. (2004). Phosphoinositides in constitutive membrane traffic. Physiol. Rev. *84*, 699–730.

Roux, A., Koster, G., Lenz, M., Sorre, B., Manneville, J.B., Nassoy, P., and Bassereau, P. (2010). Membrane curvature controls dynamin polymerization. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 4141–4146.

Rudolf, R., Salm, T., Rustom, A., and Gerdes, H.H. (2001). Dynamics of immature secretory granules: Role of cytoskeletal elements during transport, cortical restriction, and F-actin-dependent tethering. Mol. Biol. Cell *12*, 1353–1365.

~ S ~

Saliba, A.E., Vonkova, I., and Gavin, A.C. (2015). The systematic analysis of protein-lipid interactions comes of age. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *16*, 753–761.

Santiago-Tirado, F.H., and Bretscher, A. (2011). Membrane-trafficking sorting hubs: cooperation between PI4P and small GTPases at the trans-Golgi network. Trends Cell Biol. *21*, 515–525.

Sassa, T., Harada, S.I., Ogawa, H., Rand, J.B., Maruyama, I.N., and Hosono, R. (1999). Regulation of the UNC-18-Caenorhabditis elegans syntaxin complex by UNC- 13. J. Neurosci. *19*, 4772–4777.

Schmidt, A., Wolde, M., Thiele, C., Fest, W., Kratzin, H., Podtelejnikov, A. V, Witke, W., Huttner, W.B., and Söling, H.D. (1999). Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. Nature *401*, 133–141.

Schwarz, K., Natarajan, S., Kassas, N., Vitale, N., and Schmitz, F. (2011). The synaptic ribbon is a site of phosphatidic acid generation in ribbon synapses. J. Neurosci. *31*, 15996–16011.

Sciorra, V.A., Rudge, S.A., Prestwich, G.D., Frohman, M.A., Engebrecht, J., and Morris, A.J. (1999). Identification of a phosphoinositide binding motif that mediates activation of mammalian and yeast phospholipase D isoenzymes. EMBO J. *18*, 5911–5921.

Sebastião, A.M., Colino-Oliveira, M., Assaife-Lopes, N., Dias, R.B., Ribeiro, J.A. (2013). Lipid rafts, synaptic transmission and plasticity: impact in age-related neurodegenerative diseases. Neuropharmacology. *64*, 97–107.

Seidah, N.G., Day, R., and Chretien, M. (1993). The family of pro-hormone and pro-protein convertases. In Biochemical Society Transactions, pp. 685–691.

Shen, F.S., and Loh, Y.P. (1997). Intracellular misrouting and abnormal secretion of adrenocorticotropin and growth hormone in Cpefat mice associated with a carboxypeptidase E mutation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 5314–5319.

Shennan, K.I.J., Taylor, N.A., and Docherty, K. (1994). Calcium- and pH-dependent aggregation and membrane association of the precursor of the prohormone convertase PC2. J. Biol. Chem. *269*, 18646–18650.

Siddhanta, A., and Shields, D. (1998). Secretory vesicle budding from the trans-Golgi network is mediated by phosphatidic acid levels. J. Biol. Chem. *273*, 17995–17998.

Siddhanta, A., Backer, J.M., and Shields, D. (2000). Inhibition of phosphatidic acid synthesis alters the structure of the Golgi apparatus and inhibits secretion in endocrine cells. J. Biol. Chem. *275*, 12023–12031.

Singer, W.D., Brown, and, H.A., and Sternweis, P.C. (1997). Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D. Annu. Rev. Biochem. *66*, 475–509.

Sirkis, D.W., Edwards, R.H., and Asensio, C.S. (2013). Widespread Dysregulation of Peptide Hormone Release in Mice Lacking Adaptor Protein AP-3. PLoS Genet. *9*.

Smith, R.E., and Farquhar, M.G. (1966). Lysosome function in the regulation of the secretory process in cells of the anterior pituitary gland. J. Cell Biol. *31*, 319–347.

Sobota, J.A., Bäck, N., Eipper, B.A., and Mains, R.E. (2009). Inhibitors of the V0 subunit of the vacuolar H+-ATPase prevent segregation of lysosomal- and secretory-pathway proteins. J. Cell Sci. *122*, 3542–3553.

Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., and Rothman, J.E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. Nature *362*, 318–324.

Sonna, L.A., Fujita, J., Gaffin, S.L., and Lilly, C.M. (2002). Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. J. Appl. Physiol. *92*, 1725–1742.

Sørensen, J.B., Nagy, G., Varoqueaux, F., Nehring, R.B., Brose, N., Wilson, M.C., and Neher, E. (2003). Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23. Cell *114*, 75–86.

Soykan, T., Kaempf, N., Sakaba, T., Vollweiter, D., Goerdeler, F., Puchkov, D., Kononenko, N.L., and Haucke, V. (2017). Synaptic Vesicle Endocytosis Occurs on Multiple Timescales and Is Mediated by Formin-Dependent Actin Assembly. Neuron *93*, 854-866.e4.

Stace, C.L., and Ktistakis, N.T. (2006). Phosphatidic acid- and phosphatidylserine-binding proteins. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids *1761*, 913–926.

Stadinski, B.D., Delong, T., Reisdorph, N., Reisdorph, R., Powell, R.L., Armstrong, M., Piganelli, J.D., Barbour, G., Bradley, B., Crawford, F., et al. (2010). Chromogranin A is an autoantigen in type 1 diabetes. Nat. Immunol. *11*, 225–231.

Steed, P.M., Clark, K.L., Boyar, W.C., and Lasala, D.J. (1998). Characterization of human PLD2 and the analysis of PLD isoform splice variants. FASEB J. *12*, 1309–1317.

Steiner, D.F. (1998). The proprotein convertases. Curr. Opin. Chem. Biol. *2*, 31–39.

Stojilkovic, S.S. (2005). Ca2+-regulated exocytosis and SNARE function. Trends Endocrinol. Metab. *16*, 81–83.

Strub, J.M., Goumon, Y., Lugardon, K., Capon, C., Lopez, M., Moniatte, M., Van Dorsselaer, A., Aunis, D., and Metz-Boutigue, M.H. (1996). Antibacterial activity of glycosylated and phosphorylated chromogranin A-derived peptide 173-194 from bovine adrenal medullary chromaffin granules. J. Biol. Chem. *271*, 28533–28540.

Strub, J.M., Sorokine, O., Van Dorsselaer, A., Aunis, D., and Metz-Boutigue, M.H. (1997). Phosphorylation and O-glycosylation sites of bovine chromogranin A from adrenal medullary chromaffin granules and their relationship with biological activities. J. Biol. Chem. *272*, 11928–11936.

Südhof, T.C. (1995). The synaptic vesicle cycle: A cascade of protein-protein interactions. Nature *375*, 645–653.

Südhof, T.C. (2004). The synaptic vesicle cycle. Annu. Rev. Neurosci. *27*, 509–547.

Südhof, T.C., Rothman, J.E. (2009). Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. Science *323*, 474–477.

Sugawara, M., Resende, J.M., Moraes, C.M., Marquette, A., Chich, J.-F., Metz-Boutigue, M.-H., and Bechinger, B. (2010). Membrane structure and interactions of human catestatin by multidimensional solution and solid-state NMR spectroscopy. FASEB J. *24*, 1737–1746.

Sugita, S. (2008). Mechanisms of exocytosis. In Acta Physiologica, pp. 185–193.

Suh, B.-C., and Hille, B. (2008). PIP2 is a necessary cofactor for ion channel function: how and why? Annu. Rev. Biophys. *37*, 175–195.

Sumakovic, M., Hegermann, J., Luo, L., Husson, S.J., Schwarze, K., Olendrowitz, C., Schoofs, L., Richmond, J., and Eimer, S. (2009). UNC-108/RAB-2 and its effector RIC-19 are involved in dense core vesicle maturation in Caenorhabditis elegans. J. Cell Biol. *186*, 897–914.

Sun, Z.-P., Gong, L., Huang, S.-H., Geng, Z., Cheng, L., and Chen, Z.-Y. (2011). Intracellular trafficking and secretion of cerebral dopamine neurotrophic factor in neurosecretory cells. J. Neurochem. *117*, 121–132.

Sung, T.C., Altshuller, Y.M., Morris, A.J., and Frohman, M.A. (1999a). Molecular analysis of mammalian phospholipase D2. J. Biol. Chem. *274*, 494–502.

Sung, T.C., Zhang, Y., Morris, A.J., and Frohman, M.A. (1999b). Structural analysis of human phospholipase D1. J. Biol. Chem. *274*, 3659–3666.

~ T ~

Tagaya, M., Toyonaga, S., Takahashi, M., Yamamoto, A., Fujiwara, T., Akagawa, K., Moriyama, Y., and Mizushima, S. (1995). Syntaxin 1 (HPC-1) is associated with chromaffin granules. J. Biol. Chem. *270*, 15930–15933.

Tagaya, M., Genma, T., Yamamoto, A., Kozaki, S., and Mizushima, S. (1996). SNAP-25 is present on chromaffin granules and acts as a SNAP receptor. FEBS Lett. *394*, 83–86.

Takahashi, H., Yasue, T., Ohki, K., and Hatta, I. (1995). Structural and thermotropic properties of calcium-dimyristoylphosphatidic acid complexes at acidic and neutral pH conditions. Biophys. J. *69*, 1464–1472.

Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. Physiol. Rev. *81*, 153–208.

Tang, K., Wu, H., Mahata, S.K., and O'Connor, D.T. (1998). A crucial role for the mitogen-activated protein kinase pathway in nicotinic cholinergic signaling to secretory protein transcription in pheochromocytoma cells. Mol. Pharmacol. *54*, 59–69.

Tang, T.X., Xiong, W., Finkielstein, C. V., and Capelluto, D.G.S. (2017). Identification of lipid binding modulators using the protein-lipid overlay assay. In Methods in Molecular Biology, (Humana Press Inc.), pp. 197–206.

Tanguy, E., Carmon, O., Wang, Q., Jeandel, L., Chasserot-Golaz, S., Montero-Hadjadje, M., and Vitale, N. (2016). Lipids implicated in the journey of a secretory granule: from biogenesis to fusion. J. Neurochem.

Tanguy, E., Wang, Q., and Vitale, N. (2018a). Role of Phospholipase D-Derived Phosphatidic Acid in Regulated Exocytosis and Neurological Disease.

Tanguy, E., Kassas, N., and Vitale, N. (2018b). Protein–phospholipid interaction motifs: A focus on phosphatidic acid. Biomolecules *8*.

Tanguy, E., Costé de Bagneaux, P., Kassas, N., Ammar, M.R., Wang, Q., Haeberlé, A.M., Raherindratsara, J., Fouillen, L., Renard, P.Y., Montero-Hadjadje, M., et al. (2020). Mono- and Poly-unsaturated Phosphatidic Acid Regulate Distinct Steps of Regulated Exocytosis in Neuroendocrine Cells. Cell Rep. *32*.

Tartakoff, A., Vassalli, P., and DéTraz, M. (1978). Comparative studies of intracellular transport of secretory proteins. J. Cell Biol. *79*, 694–707.

Tatemoto, K., Efendić, S., Mutt, V., Makk, G., Feistner, G.J., and Barchas, J.D. (1986). Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion. Nature *324*, 476–478.

Taupenot, L., Mahata, S.K., Wu, H., and O'Connor, D.T. (1998). Peptidergic activation of transcription and secretion in chromaffin cells: cis and trans signaling determinants of pituitary adenylyl cyclase- activating polypeptide (PACAP). J. Clin. Invest. *101*, 863–876.

Taupenot, L., Harper, K.L., Mahapatra, N.R., Parmer, R.J., Mahata, S.K., and O'Connor, D.T. (2002). Identification of a novel sorting determinant for the regulated pathway in the secretory protein chromogranin A. J. Cell Sci. *115*, 4827–4841.

Taupenot, L., Harper, K.L., and O'Connor, D.T. (2003). The Chromogranin–Secretogranin Family. N. Engl. J. Med. *348*, 1134–1149.

Taupenot, L., Harper, K.L., and O'Connor, D.T. (2005). Role of H+-ATPase-mediated acidification in sorting and release of the regulated secretory protein chromogranin A: Evidence for a vesiculogenic function. J. Biol. Chem. *280*, 3885–3897.

Terasaki, M., Loew, L., Lippincott-Schwartz, J., and Zaal, K. (1998). Fluorescent Staining of Subcellular Organelles: ER, Golgi Complex, and Mitochondria. Curr. Protoc. Cell Biol. *00*, 4.4.1-4.4.18.

Thieringer, H.A., Jones, P.G., and Inouye, M. (1998). Cold shock and adaptation. BioEssays *20*, 49–57.

Toonen, R.F.G., De Vries, K.J., Zalm, R., Südhof, T.C., and Verhage, M. (2005). Munc18-1 stabilizes syntaxin 1, but is not essential for syntaxin 1 targeting and SNARE complex formation. J. Neurochem. *93*, 1393–1400.

Toonen, R.F.G., Wierda, K., Sons, M.S., de Wit, H., Cornelisse, L.N., Brussaard, A., Plomp, J.J., and Verhage, M. (2006). Munc18-1 expression levels control synapse recovery by regulating readily releasable pool size. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 18332–18337.

Tooze, S.A. (1998). Biogenesis of secretory granules in the trans-Golgi network of neuroendocrine and endocrine cells. Biochim. Biophys. Acta *1404*, 231–244.

Tooze, J., and Tooze, S.A. (1986). Clathrin-coated vesicular transport of secretory proteins during the formation of ACTH-containing secretory granules in AtT20 cells. J. Cell Biol. *103*, 839–850.

Tooze, S.A., and Huttner, W.B. (1990). Cell-free protein sorting to the regulated and constitutive secretory pathways. Cell *60*, 837–847.

Tooze, S.A., Flatmark, T., Tooze, J., and Huttner, W.B. (1991). Characterization of the immature secretory granule, an intermediate in granule biogenesis. J. Cell Biol. *115*, 1491–1503.

Topham, M.K. (2006). Signaling roles of diacylglycerol kinases. J. Cell. Biochem. *97*, 474–484.

Trifaró, J.M., Rosé, S.D., and Marcu, M.G. (2000). Scinderin, a Ca2+-dependent actin filament severing protein that controls cortical actin network dynamics during secretion. Neurochem. Res. *25*, 133–144.

Tsai, C.C., Yang, C.C., Shin, P.Y., Wu, C.S., Chen, C.D., Pan, C.Y., and Chen, Y.T. (2008). Exocytosis of a single bovine adrenal chromaffin cell: The electrical and morphological studies. J. Phys. Chem. B *112*, 9165–9173.

Tsuboi, T., McMahon, H.T., and Rutter, G.A. (2004). Mechanisms of dense core vesicle recapture following "kiss and run" ("cavicapture") exocytosis in insulin-secreting cells. J. Biol. Chem. *279*, 47115–47124.

Tsuboi, T., Ravier, M.A., Parton, L.E., Rutter, G.A. (2006). Sustained exposure to high glucose concentrations modifies glucose signaling and the mechanics of secretory vesicle fusion in primary rat pancreatic beta-cells. Diabetes. 55, 1057-1065.

~ U ~

Umbrecht-Jenck, E., Demais, V., Calco, V., Bailly, Y., Bader, M.-F., and Chasserot-Golaz, S. (2010). S100A10-mediated translocation of annexin-A2 to SNARE proteins in adrenergic chromaffin cells undergoing exocytosis. Traffic *11*, 958–971.

Urbé, S., Dittié, A.S., and Tooze, S.A. (1997). pH-dependent processing of secretogranin II by the endopeptidase PC2 in isolated immature secretory granules. Biochem. J. *321 (Pt 1)*, 65–74.

Urbé, S., Page, L.J., and Tooze, S.A. (1998). Homotypic fusion of immature secretory granules during maturation in a cell-free assay. J. Cell Biol. *143*, 1831–1844.

~ V ~

Vance, D.E., and Goldfine, H. (2002). Konrad Bloch--a pioneer in cholesterol and fatty acid biosynthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. *292*, 1117–1127.

Vance, J.E., and Vance, D.E. (2004). Phospholipid biosynthesis in mammalian cells. Biochem. Cell Biol. *82*, 113–128.

Varadi, A., Tsuboi, T., Johnson-Cadwell, L.I., Allan, V.J., and Rutter, G.A. (2003). Kinesin I and cytoplasmic dynein orchestrate glucose-stimulated insulin-containing vesicle movements in clonal MIN6 beta-cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. *311*, 272–282.

Verkleij, A.J., De Maagd, R., Leunissen-Bijvelt, J., and De Kruijff, B. (1982). Divalent cations and chlorpromazine can induce non-bilayer structures in phosphatidic acid-containing model membranes. Biochim. Biophys. Acta *684*, 255–262.

Vitale, N. (2010). Synthesis of fusogenic lipids through activation of phospholipase D1 by GTPases and the kinase RSK2is required for calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine cells. Biochem. Soc. Trans. *38*, 167–171.

Vitale, N., Chasserot-Golaz, S., Bailly, Y., Morinaga, N., Frohman, M.A., and Bader, M.F. (2002). Calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles requires the activation of ADP-ribosylation factor (ARF)6 by ARF nucleotide binding site opener at the plasma membrane. J. Cell Biol. *159*, 79–89.

Voets, T., Toonen, R.F., Brian, E.C., De Wit, H., Moser, T., Rettig, J., Südhof, T.C., Neher, E., and Verhage, M. (2001). Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking. Neuron *31*, 581–592.

~ W ~

Wan, Q.-F., Dong, Y., Yang, H., Lou, X., Ding, J., and Xu, T. (2004). Protein kinase activation increases insulin secretion by sensitizing the secretory machinery to Ca2+. J. Gen. Physiol. *124*, 653–662.

Wang, Y., Okamoto, M., Schmitz, F., Hofmann, K., and Südhof, T.C. (1997). Rim is a putative rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. Nature *388*, 593–598.

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.

Waymire, J.C., Bennett, W.F., Boehme, R., Hankins, L., Gilmer-Waymire, K., and Haycock, J.W. (1983). Bovine adrenal chromaffin cells: high-yield purification and viability in suspension culture. J. Neurosci. Methods *7*, 329–351.

Weinberger, A., Tsai, F.C., Koenderink, G.H., Schmidt, T.F., Itri, R., Meier, W., Schmatko, T., Schröder, A., and Marques, C. (2013). Gel-assisted formation of giant unilamellar vesicles. Biophys. J. *105*, 154–164.

Weixel, K.M., Blumental-Perry, A., Watkins, S.C., Aridor, M., and Weisz, O.A. (2005). Distinct Golgi populations of phosphatidylinositol 4-phosphate regulated by phosphatidylinositol 4-kinases. J. Biol. Chem. *280*, 10501–10508.

Wendler, F., Page, L., Urbé, S., and Tooze, S.A. (2001). Homotypic fusion of immature secretory granules during maturation requires syntaxin 6. Mol. Biol. Cell *12*, 1699–1709.

Whatmore, J., Morgan, C.P., Cunningham, E., Collison, K.S., Willison, K.R., and Cockcroft, S. (1996). ADP-ribosylation factor 1-regulated phospholipase D activity is localized at the plasma membrane and intracellular organelles in HL60 cells. Biochem. J. *320*, 785–794.

Winkler, H., and Fischer-Colbrie, R. (1992). The chromogranins A and B: The first 25 years and future perspectives. Neuroscience *49*, 497–528.

Wu, L.-G., Hamid, E., Shin, W., and Chiang, H.-C. (2014a). Exocytosis and Endocytosis: Modes, Functions, and Coupling Mechanisms. Annu. Rev. Physiol. *76*, 301–331.

Wu, M.M., Grabe, M., Adams, S., Tsien, R.Y., Moore, H.P.H., and Machen, T.E. (2001). Mechanisms of pH Regulation in the Regulated Secretory Pathway. J. Biol. Chem. *276*, 33027–33035.

Wu, X.-S., McNeil, B.D., Xu, J., Fan, J., Xue, L., Melicoff, E., Adachi, R., Bai, L., and Wu, L.-G. (2009). Ca(2+) and calmodulin initiate all forms of endocytosis during depolarization at a nerve terminal. Nat. Neurosci. *12*, 1003–1010.

Wu, X.-S., Lee, S.H., Sheng, J., Zhang, Z., Zhao, W.-D., Wang, D., Jin, Y., Charnay, P., Ervasti, J.M., and Wu, L.-G. (2016). Actin Is Crucial for All Kinetically Distinguishable Forms of Endocytosis at Synapses. Neuron *92*, 1020–1035.

Wu, X.S., Zhang, Z., Zhao, W.D., Wang, D., Luo, F., and Wu, L.G. (2014b). Calcineurin is

universally involved in vesicle endocytosis at neuronal and nonneuronal secretory cells. Cell Rep. *7*, 982–988.

Wu, Z., Thiyagarajan, S., O'Shaughnessy, B., Karatekin, E. (2017). Regulation of Exocytotic Fusion Pores by SNARE Protein Transmembrane Domains. Front Mol Neurosci.*10*, 315.

~ X ~

Xie, S., Naslavsky, N., and Caplan, S. (2015). Diacylglycerol kinases in membrane trafficking. Cell. Logist. *5*.

Xie, Z., Ho, W.T., and Exton, J.H. (1998). Association of N- and C-terminal domains of phospholipase D is required for catalytic activity. J. Biol. Chem. *273*, 34679–34682.

Xu, Y., Seet, L.F., Hanson, B., and Hong, W. (2001). The Phox homology (PX) domain, a new player in phosphoinositide signalling. Biochem. J. *360*, 513–530.

~ Y ~

Yamabhai, M., Hoffman, N.G., Hardison, N.L., McPherson, P.S., Castagnoli, L., Cesareni, G., and Kay, B.K. (1998). Intersectin, a novel adaptor protein with two Eps15 homology and five Src homology 3 domains. J Biol Chem *273*, 31401–31407.

Yang, C.Y., and Frohman, M.A. (2012). Mitochondria: Signaling with phosphatidic acid. Int. J. Biochem. Cell Biol. *44*, 1346–1350.

Yang, J.-S., Gad, H., Lee, S.Y., Mironov, A., Zhang, L., Beznoussenko, G. V, Valente, C., Turacchio, G., Bonsra, A.N., Du, G., et al. (2008). COPI vesicle fission: a role for phosphatidic acid and insight into Golgi maintenance. Nat. Cell Biol. *10*, 1146–1153.

Yao, J., and Hersh, L.B. (2007). The vesicular monoamine transporter 2 contains trafficking signals in both its N-glycosylation and C-terminal domains. J. Neurochem. *100*, 1387–1396.

Yao, J., Erickson, J.D., and Hersh, L.B. (2004). Protein kinase A affects trafficking of the vesicular monoamine transporters in PC12 cells. Traffic *5*, 1006–1016.

Yao, J., Kwon, S.E., Gaffaney, J.D., Dunning, F.M., and Chapman, E.R. (2011). Uncoupling the roles of synaptotagmin I during endo- and exocytosis of synaptic vesicles. Nat. Neurosci. *15*, 243–249.

Yeung, T., Gilbert, G.E., Shi, J., Silvius, J., Kapus, A., and Grinstein, S. (2008). Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. Science (80-.). *319*, 210–213.

Yoo, S.H. (1996). pH- and Ca2+-dependent aggregation property of secretory vesicle matrix proteins and the potential role of chromogranins A and B in secretory vesicle biogenesis. J. Biol. Chem. *271*, 1558–1565.

Yoo, S.H. (2000). Coupling of the IP3 receptor/Ca2+ channel with Ca2+ storage proteins chromogranins A and B in secretory granules. Trends Neurosci. *23*, 424–428.

Yoo, S.H., So, S.H., Kweon, H.S., Lee, J.S., Kang, M.K., Jeon, C.J. (2000). Coupling of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and chromogranins A and B in secretory granules. J Biol Chem. *275*, 12553–9.

Yoo, S.H. (2011). Role of secretory granules in inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent Ca(2+) signaling: from phytoplankton to mammals. Cell Calcium *50*, 175–183.

Yoo, S.H., and Hur, Y.S. (2012). Enrichment of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca2+ channels in secretory granules and essential roles of chromogranins. Cell Calcium *51*, 342–350.

Yoo, S.H., You, S.H., and Huh, Y.H. (2005). Presence of syntaxin 1A in secretory granules of chromaffin cells and interaction with chromogranins A and B. FEBS Lett. *579*, 222–228.

Young, B.P., Shin, J.J.H., Orij, R., Chao, J.T., Li, S.C., Guan, X.L., Khong, A., Jan, E., Wenk, M.R., Prinz, W.A., et al. (2010). Phosphatidic acid is a pH biosensor that links membrane biogenesis to metabolism. Science (80-.). *329*, 1085–1088.

Yuan, T., Liu, L., Zhang, Y., Wei, L., Zhao, S., Zheng, X., Huang, X., Boulanger, J., Gueudry, C., Lu, J., et al. (2015). Diacylglycerol Guides the Hopping of Clathrin-Coated Pits along Microtubules for Exo-Endocytosis Coupling. Dev. Cell *35*, 120–130.

~ Z ~

Zegarlińska, J., Piaścik, M., Sikorski, A.F., and Czogalla, A. (2018). Phosphatidic acid - A simple phospholipid with multiple faces. Acta Biochim. Pol. *65*, 163–171.

Zeniou-Meyer, M., Zabari, N., Ashery, U., Chasserot-Golaz, S., Haeberlé, A.-M., Demais, V., Bailly, Y., Gottfried, I., Nakanishi, H., Neiman, A.M., et al. (2007a). Phospholipase D1 production of phosphatidic acid at the plasma membrane promotes exocytosis of large dense-core granules at a late stage. J. Biol. Chem. *282*, 21746–21757.

Zeniou-Meyer, M., Zabari, N., Ashery, U., Chasserot-Golaz, S., Haeberle, A.M., Demais, V., Bailly, Y., Gottfried, I., Nakanishi, H., Neiman, A.M., et al. (2007b). Phospholipase D1 production of phosphatidic acid at the plasma membrane promotes exocytosis of large dense-core granules at a late stage. J. Biol. Chem. *282*, 21746–21757.

Zerial, M., and McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *2*, 107–117.

Zhang, C.-F., Dhanvantari, S., Lou, H., and Loh, Y.P. (2003). Sorting of carboxypeptidase E to the regulated secretory pathway requires interaction of its transmembrane domain with lipid rafts. Biochem. J. *369*, 453–460.

Zhou, K., and Blom, T. (2015). Trafficking and functions of bioactive sphingolipids: Lessons

from cells and model membranes. Lipid Insights *2015*, 11–20.

Zhu, Y., Xu, J., and Heinemann, S.F. (2009). Synaptic vesicle exocytosis-endocytosis at central synapses: Fine-tuning at differential patterns of neuronal activity. Commun. Integr. Biol. *2*, 418–419.

ANNEXES

Liste des publications annexes

(Article) **Myosin 1b and F-actin are involved in the control of secretory granule biogenesis**.
Delestre-Delacour C., Carmon O., Laguerre F., Estay-Ahumada C., Courel M., Elias S., Jeandel L., Villar Rayo M., Peinado JR., Sengmanivong L., Gasman S., Coudrier E., Anouar Y. & Montero-Hadjadje M.
Sci Rep. 2017 Jul 12;7(1):5172. doi: 10.1038/s41598-017-05617-1.

(Revue) **Chromogranin A in the early steps of the neurosecretory pathway.**
Laguerre F., Anouar Y. & Montero-Hadjadje M.
IUBMB Life. 2020 Apr;72(4):524-532. doi: 10.1002/iub.2218.

(Chapitre de livre) **Chromogranins as molecular coordinators at the crossroads between hormone aggregation and secretory granules biogenesis.**
Carmon O., Laguerre F., Jeandel L., Anouar Y. & Montero-Hadjadje M.
Chromogranins: form Cell Biology to Physiology and Biomedicine, Unipa Springer Series, 2017.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Myosin 1b and F-actin are involved in the control of secretory granule biogenesis

Received: 16 January 2017
Accepted: 31 May 2017
Published online: 12 July 2017

Charlène Delestre-Delacour[1], Ophélie Carmon[1], Fanny Laguerre[1], Catherine Estay-Ahumada[2], Maïté Courel[1,7], Salah Elias[1,8], Lydie Jeandel[1], Margarita Villar Rayo[3], Juan R. Peinado[4], Lucie Sengmanivong[5], Stéphane Gasman[2], Evelyne Coudrier[6], Youssef Anouar[1] & Maité Montero-Hadjadje[1]

Hormone secretion relies on secretory granules which store hormones in endocrine cells and release them upon cell stimulation. The molecular events leading to hormone sorting and secretory granule formation at the level of the TGN are still elusive. Our proteomic analysis of purified whole secretory granules or secretory granule membranes uncovered their association with the actomyosin components myosin 1b, actin and the actin nucleation complex Arp2/3. We found that myosin 1b controls the formation of secretory granules and the associated regulated secretion in both neuroendocrine cells and chromogranin A-expressing COS7 cells used as a simplified model of induced secretion. We show that F-actin is also involved in secretory granule biogenesis and that myosin 1b cooperates with Arp2/3 to recruit F-actin to the Golgi region where secretory granules bud. These results provide the first evidence that components of the actomyosin complex promote the biogenesis of secretory granules and thereby regulate hormone sorting and secretion.

Besides the constitutive secretory pathway which is involved in the renewing of plasma membrane and extracellular matrix in all eukaryotic cell types, a regulated secretory pathway is specialized in hormone release in endocrine cells. The vesicular membrane structures at the origin of these secretory pathways, called constitutive vesicles and secretory granules respectively, arise by budding from the trans-Golgi network (TGN) membrane. However, the molecular mechanisms linking hormone sorting, TGN membrane and secretory granule formation are still poorly understood. Like all biological membranes, the TGN membrane is composed of a specific lipid and protein mix resulting in a proper lateral organization that supports the function of the TGN compartment[1]. Membrane-interacting cytosolic proteins are necessary to the dynamic morphology and to the functional organization of the TGN membrane, and include for example enzymes involved in the phospholipid remodeling[2] or proteins with Bin/Amphiphysin/Rvs domains capable of sensing and/or stabilizing membrane curvature[3,4]. Actin and its associated motors have also been shown to interact with the TGN membrane and to modulate its topology, as demonstrated for myosin II which promotes the fission of constitutive secretory vesicles[5], and myosin 1b which induces the formation of post-Golgi carriers in HeLa cells[6]. Interestingly, proteomic studies of secretory granules identified many actin-interacting proteins, including myosins[7,8], which could contribute to the control of different steps of endocrine secretion. Among these, myosin VI has been shown to control secretory granule exocytosis[9] whereas myosin 1b has currently no known function in endocrine cells.

[1]Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM, U1239, Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale de Normandie, 76000, Rouen, France. [2]Université de Strasbourg, CNRS UPR 3212, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, 67000, Strasbourg, France. [3]Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos, Proteomics Core Facility, 13071, Ciudad Real, Spain. [4]Laboratory of oxidative stress and neurodegeneration, Facultad de Medicina de Ciudad Real, 13071, Ciudad Real, Spain. [5]Institut Curie - PSL Research University, Membrane Dynamics and Mechanics of Intracellular Signaling Laboratory, Nikon Imaging Centre, 75005, Paris, France. [6]CNRS UMR 144 Cell Signaling and Morphogenesis, Institut Curie, 75005, Paris, France. [7]Present address: CNRS-UPMC FRE3402, Pierre et Marie Curie University, 75252, Paris, Cedex 05, France. [8]Present address: University of Oxford, Sir William Dunn School of Pathology, Oxford, Oxfordshire, United Kingdom. Charlène Delestre-Delacour and Ophélie Carmon contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to Y.A. (email: youssef.anouar@univ-rouen.fr) or M.M.-H. (email: maite.montero@univ-rouen.fr)

Since myosin 1b binds to F-actin through its motor domain and to membrane phosphoinositides probably through its pleckstrin homology motif[10,11] on the one hand, and on the other, facilitates the extraction of tubular structures under conditions of increasing membrane extension[12], we postulated that this myosin and associated F-actin are good candidates to regulate the early steps of secretory granule formation in endocrine cells. In the present study, we observed the occurrence of myosin 1b (Myo1b) in the TGN area and on immature secretory granules of endocrine cells, and found that depletion of Myo1b using small interfering RNA (siRNA) significantly reduces *(i)* the number of secretory granules, *(ii)* regulated secretion and *(iii)* the distribution of F-actin in the Golgi region. In fact, F-actin depolymerization and Arp2/3 complex inhibition phenocopied the effect of Myo1b down-regulation on secretory granule formation. Collectively these results show for the first time the implication of the actomyosin system in the biogenesis of secretory granules and thus in hormone sorting through the regulated secretory pathway in endocrine cells.

Results

Myosin 1b is associated with the trans-Golgi network and immature secretory granules in neuroendocrine PC12 cells. We first analyzed the expression and distribution of myosin 1b (Myo1b) in neuroendocrine PC12 cells. Western blot analysis of PC12 cell lysates and purified secretory granules revealed the cofractionation of Myo1b and VAMP2 (vesicle-associated membrane protein 2), a specific marker of secretory granule membrane (Fig. 1a). Analysis of Myo1b distribution in PC12 cells by confocal microscopy coupled to immunofluorescence (IF) revealed that this protein is associated with 47 + 18% of secretory granules labeled with chromogranin A (CgA), a marker of secretory granules (Fig. 1b). Using antibodies raised against TGN46, a marker of the trans-Golgi network, and against furin, a prohormone convertase mainly localized in immature secretory granules just after their budding from the TGN membrane, we observed that Myo1b is mainly located in the TGN area (Fig. 1c) and in 89 + 8% of immature CgA-containing secretory granules (Fig. 1d). Together, these results show that Myo1b is associated with secretory granules at the level of the TGN, most likely to promote the budding of immature secretory granules.

Myosin 1b controls the biogenesis of secretory granules. To demonstrate the implication of Myo1b in the biogenesis of secretory granules, we used the neuroendocrine PC12 cells as well as a simplified model consisting of COS7 cells expressing CgA which has been shown to induce secretory granule-like structures in these cells[8,13]. Myosin 1b gene silencing in these cells was achieved through a home-designed short interfering RNA (Myo1bH siRNA) validated in the study of Almeida *et al.*[6], which affords a strong reduction in Myo1b expression. Indeed, transfection of this siRNA significantly reduced Myo1b expression in both COS7-CgA (Fig. 2a) and PC12 (Fig. 2b) cells. This decrease in Myo1b expression did not alter CgA expression in PC12 cells (Fig. 2c), thus ruling out the possibility of an effect of Myo1b through altered CgA expression. Under these conditions and using confocal microscopy coupled to IF, we observed a significant reduction in the number of CgA-containing granules in both PC12 (Fig. 2d) and COS7-CgA (Fig. 2e) cells. This result shows that Myo1b could play a key role in the formation of secretory granules. We then investigated whether Myo1b knockdown alters the formation of secretory granules at the TGN level by fast time-lapse imaging of COS7 cells expressing CgA-GFP, using a spinning disc-equipped confocal microscope. Five hours after cell transfection, we observed numerous CgA-GFP-containing granules around the Golgi area moving towards the cytoplasm in control siRNA-treated cells (Fig. 3a; Movie 1), and we found that the number of CgA-GFP granules generated was significantly reduced in Myo1b siRNA-treated cells (Fig. 3b,c; Movie 2). Moreover, in the latter case, the granules generated moved faster than those observed in control cells treated with a scramble siRNA (Fig. 3d; Movies 1, 2). Thus, the absence of Myo1b alters not only the number but also the dynamics of CgA-GFP containing vesicles, which suggests together with the distribution data described above that the motor protein is involved in the initiation of secretory granule formation from the Golgi complex.

Myosin 1b depletion increases basal secretion. Given the impact of Myo1b expression on the number of secretory granules, we analyzed the effect of this myosin on the secretory competence of PC12 and COS7-CgA cells using CgA release as an index of the regulated secretory pathway. This analysis showed that Myo1b knockdown results in increased basal release of CgA in both cell models (Fig. 4a,b). We also studied the distribution of CgA in the constitutive and the regulated secretory pathways in the absence of Myo1b. Using an antibody raised against collagen III, a protein of the extracellular matrix of fibroblasts which is addressed to the constitutive secretory pathway, we found that Myo1b down-regulation provokes a significant increase in the number of vesicular organelles containing both collagen III and CgA (Fig. 4c). These results indicate that CgA is misrouted to the constitutive secretory pathway in the absence of Myo1b, leading to its increased release in basal conditions. Together, these data show that Myo1b controls secretory protein sorting toward the regulated pathway.

Actin and actin-related proteins are also required for the biogenesis of secretory granules. In addition to those previously identified through proteomic characterization of whole secretory granules[8], further analysis of purified secretory granule membranes revealed the occurrence of several other F-actin components, effectors and regulators with known functions at the level of the Golgi complex (Table 1). Among these proteins, Arp2/3 and actin cytoplasmic 1 and 2 have been reported to promote the formation of post-Golgi carriers by regulating membrane remodeling at the TGN in HeLa cells[6], suggesting that actin could cooperate with Myo1b at the level of the TGN membrane to regulate secretory granule formation. To determine the role of F-actin in secretory granules biogenesis, we depolymerized F-actin using latrunculin B and inhibited actin nucleation mediated by the Arp2/3 complex using CK-666, in COS7-CgA and PC12 cells. F-actin depolymerization led to a significant decrease in the number of CgA granules (up to 50% and 10% in COS7-CgA and PC12 cells, respectively) (Fig. 5a,b), thus revealing a key function of F-actin in the regulation of secretory granule formation. IF analysis of

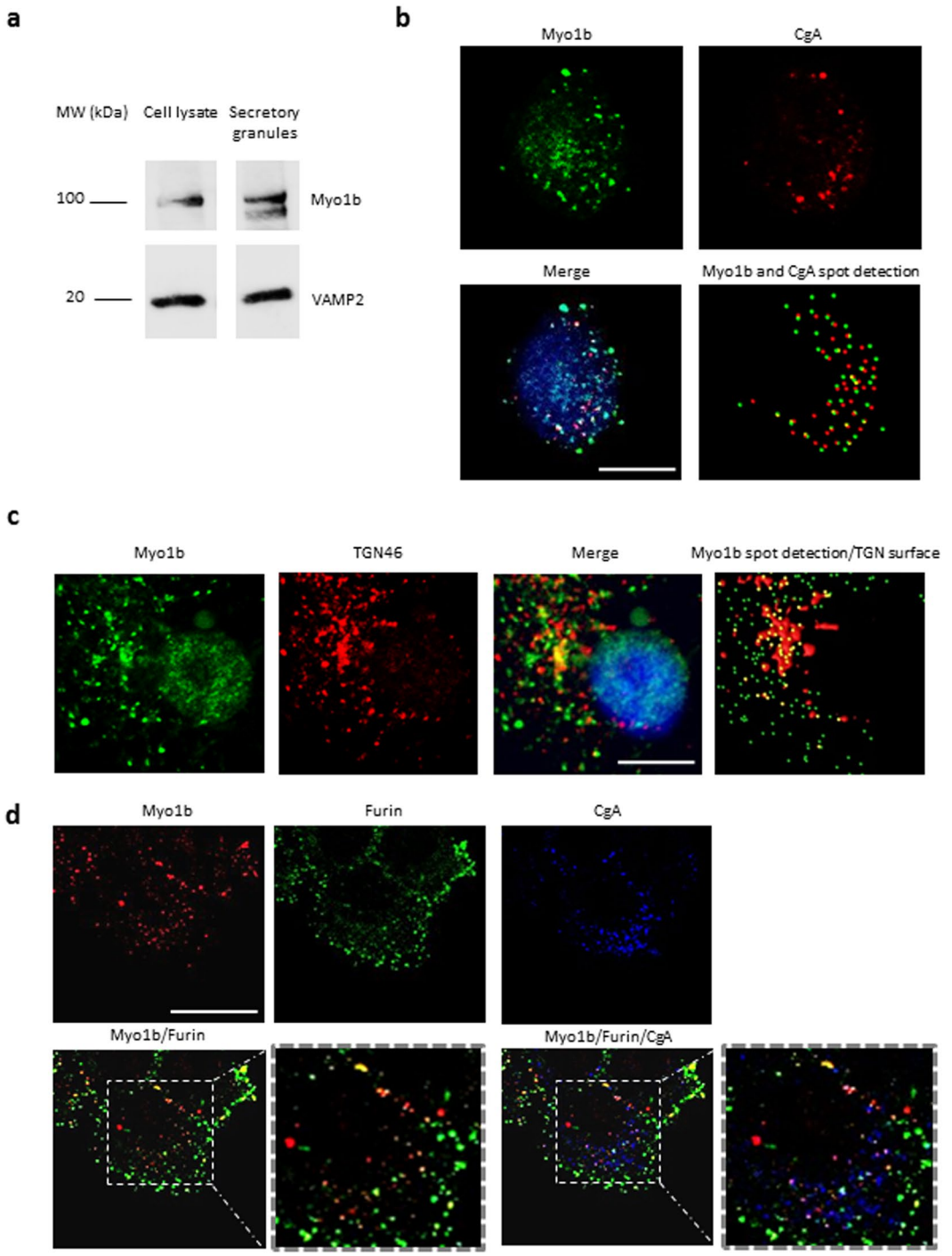


Figure 1. Myosin 1b is associated with the trans-Golgi network and secretory granules in PC12 cells. (**a**) Cropped and color inverted blots showing protein expression levels of myosin 1b (Myo1b) and VAMP2 in a PC12 cell lysate and secretory granule-containing fraction. (Full image of each tested protein are reported in Supplementary Figure S1). (**b**–**d**) PC12 cells were immunolabeled with anti-TGN46, Myo1b, CgA and furin antibodies. (**b**) Representative confocal microscopy sections throughout the cell show a partial overlap of Myo1b and CgA-containing secretory granules (47 ± 18%, with a 0.409 Pearson correlation coefficient, from three independent experiments, n = 39 cells). (**c**) Representative confocal microscopy sections throughout the cell show an overlap of Myo1b labeling and a TGN marker. (**d**) Representative confocal microscopy sections throughout the cell show an overlap of Myo1b and CgA-containing immature secretory granules labeled by furin (89 ± 8%, from three independent experiments, n = 66 cells). Scale bar represents 10 µm.

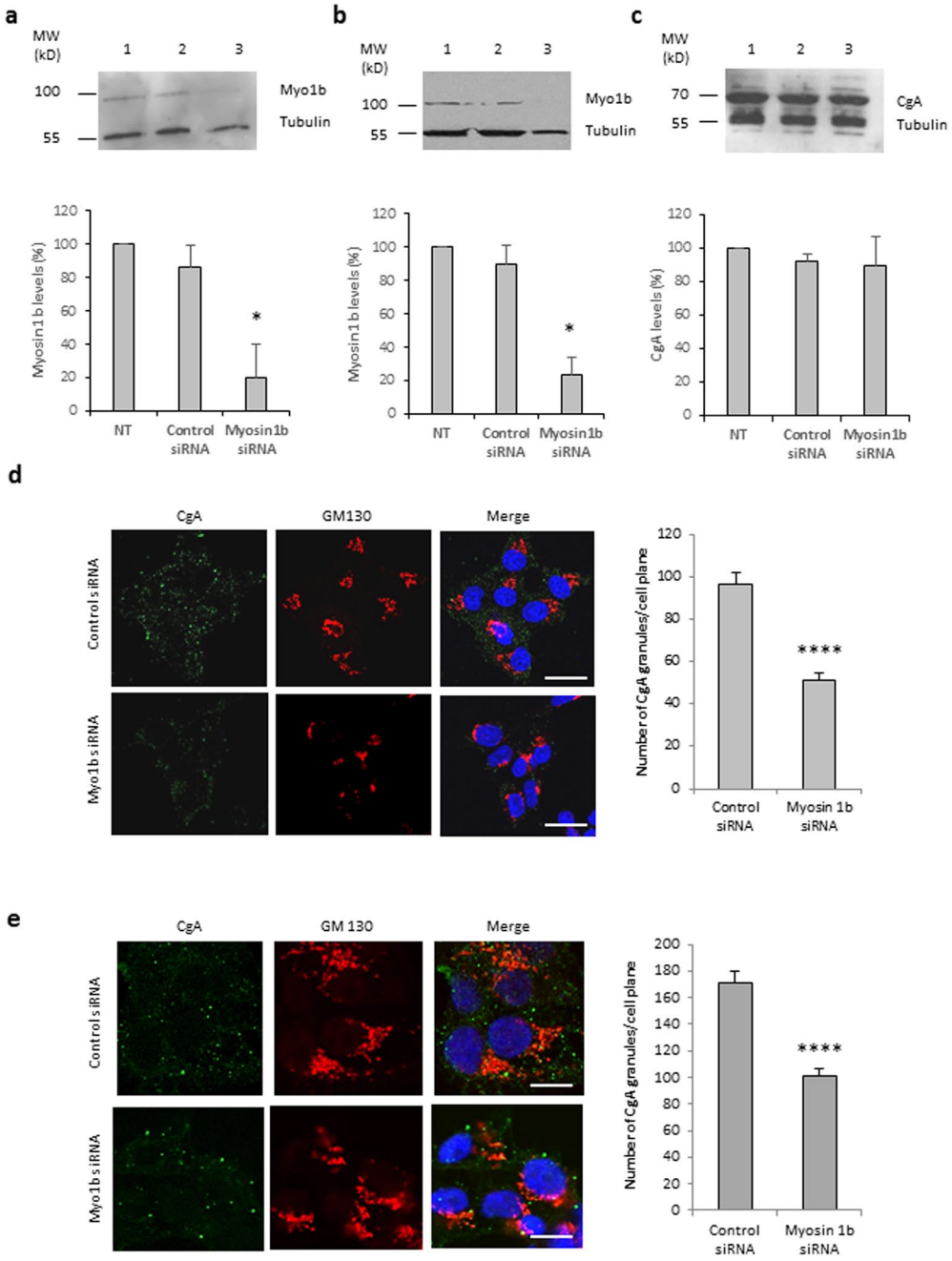


Figure 2. Myosin 1b depletion reduces the biogenesis of CgA-containing granules in PC12 and COS7 cells. (**a**–**c**) Protein extracts were analyzed by immunoblotting. Cropped blots showing protein expression levels of Myo1b and tubulin in lysates of COS7-CgA cells (**a**) or PC12 cells (**b**), non-transfected (lane 1), transfected with control siRNA (lane 2) or myosin 1b siRNA (lane 3). (**c**) Cropped blots showing protein expression levels of CgA and tubulin in lysates of PC12 cells, non-transfected (lane 1), transfected with control siRNA (lane 2) or myosin 1b siRNA (lane 3). Histograms represent a semi-quantitative analysis of the amount of myosin 1b or CgA found in cells transfected with control siRNA or myosin 1b siRNA from three independent experiments. *$P < 0.05$ (Mann-Whitney test). (Full-length blots of each tested protein are reported in Supplementary Figure S2). (**d**) PC12 cells were transfected with control siRNA or Myo1b siRNA, fixed, immunolabelled with anti-CgA and GM130 antibodies, and analyzed by confocal microscopy. Representative confocal microscopy sections throughout the cells are shown. The scale bar represents 10 µm. The number of CgA granules in PC12 cells transfected with control siRNA or Myo1b siRNA was quantified and expressed as mean + s.e.m. from three independent experiments ($n = 36$ cells). ****$P < 0.0001$ (Student's t -test with Welch's correction). (**e**) COS7-CgA cells were transfected with control siRNA or Myo1b siRNA, fixed, immunolabelled with anti-CgA and GM130 antibodies, and the distribution of CgA was analyzed by confocal microscopy. Representative confocal microscopy sections throughout the cells are shown. The scale bar represents 10 µm. The number of CgA granules in COS7-CgA cells, transfected with control siRNA or myosin 1b siRNA, was quantified and expressed as mean + s.e.m. from three independent experiments ($n = 43$ cells). ****$P < 0.0001$ (Mann-Whitney test).

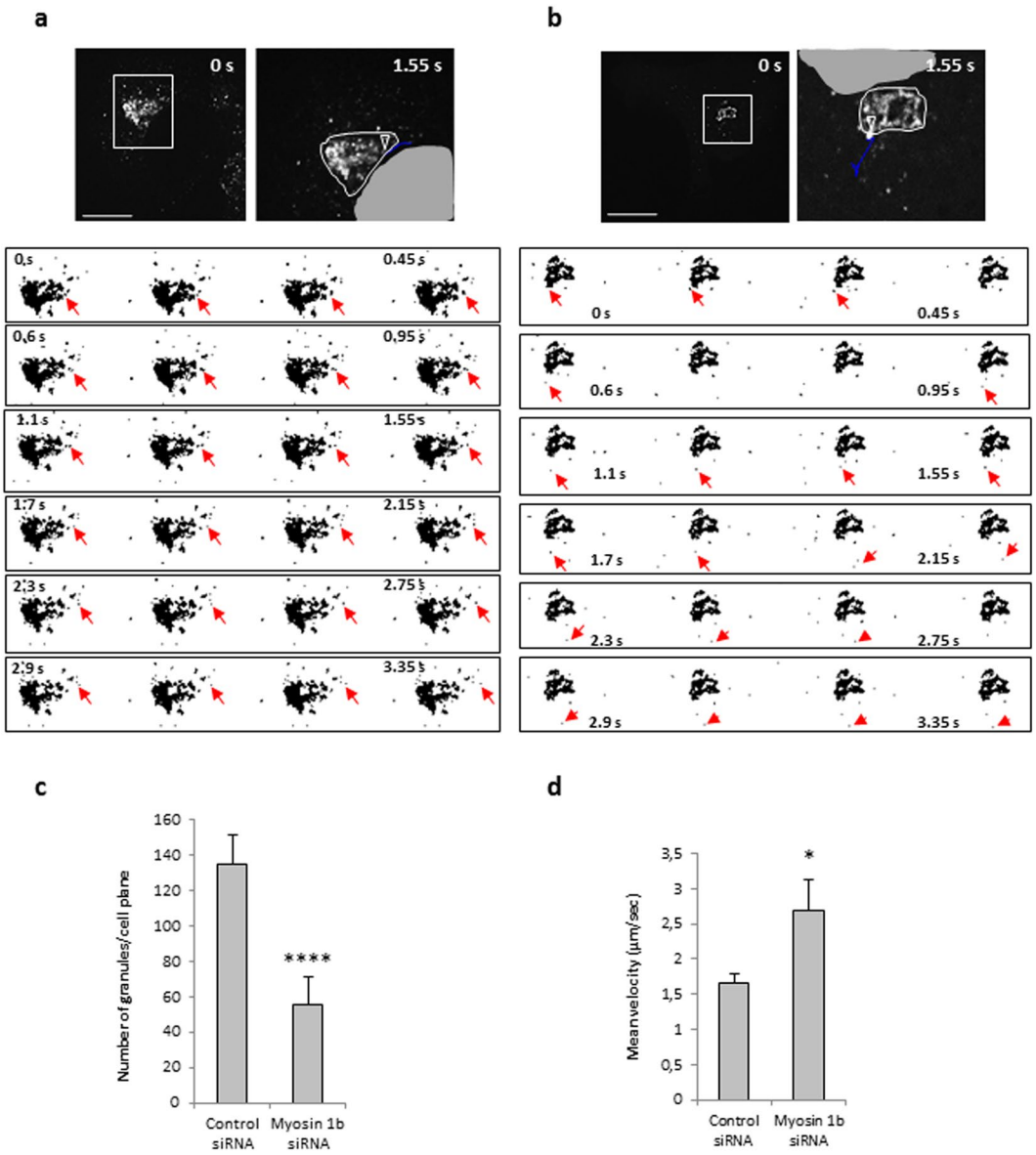


Figure 3. Myo1b depletion alters the number and the velocity of CgA granules. COS7 cells were first transfected with control siRNA (**a**) or myosin1b siRNA (**b**), and 24 h later with a plasmid encoding CgA-GFP. CgA-GFP carriers were monitored 5 h later at 37 °C by time-lapse imaging using spinning-disc confocal microscopy (see Movies 1 and 2). The first frames of representative movies (that cover 3.5 s) revealing the sequence of events of granule formation are shown. White boxes indicate the enlarged TGN region shown in image sequences. The right image in each panel corresponds to the enlarged region showing granule trajectory (in blue) along the image sequence, using the 'manual tracking' plugin of Image J. The arrow head indicates the position of the granule at the beginning of the tracking. The white line delimitates the Golgi region and the grey zone corresponds to part of the nucleus. The scale bars represent 10 µm. The red arrows indicate the position of the tracked granule every 150 ms. (**c**) The number of CgA-GFP granules was quantified, and expressed as mean + s.e.m. from three independent experiments (n = 20–24 cells). ****$P < 0.0001$ (Mann-Whitney test). (**d**) The mean velocities were calculated as the cumulated displacement of the granule from the location of its first observation to the end of the observation period with respect to the time of observation, and expressed as mean + s.e.m. from three independent experiments (N = 14–19 cells, n = 22–69 granules). *$P < 0.05$ (Mann-Whitney test).

the Arp2/3 p34 subunit distribution confirmed that CK-666 treatment inhibits the recruitment of Arp2/3 complex and F-actin to the Golgi region (Fig. 6a). Inhibition of Arp2/3 complex also provoked a significant reduction in the number of secretory granules (up to 50% in COS7-CgA and PC12 cells) (Fig. 6b,c). Taken together, these observations demonstrate that Arp2/3-dependent recruitment of F-actin in the Golgi area is required for the regulation of secretory granule biogenesis.

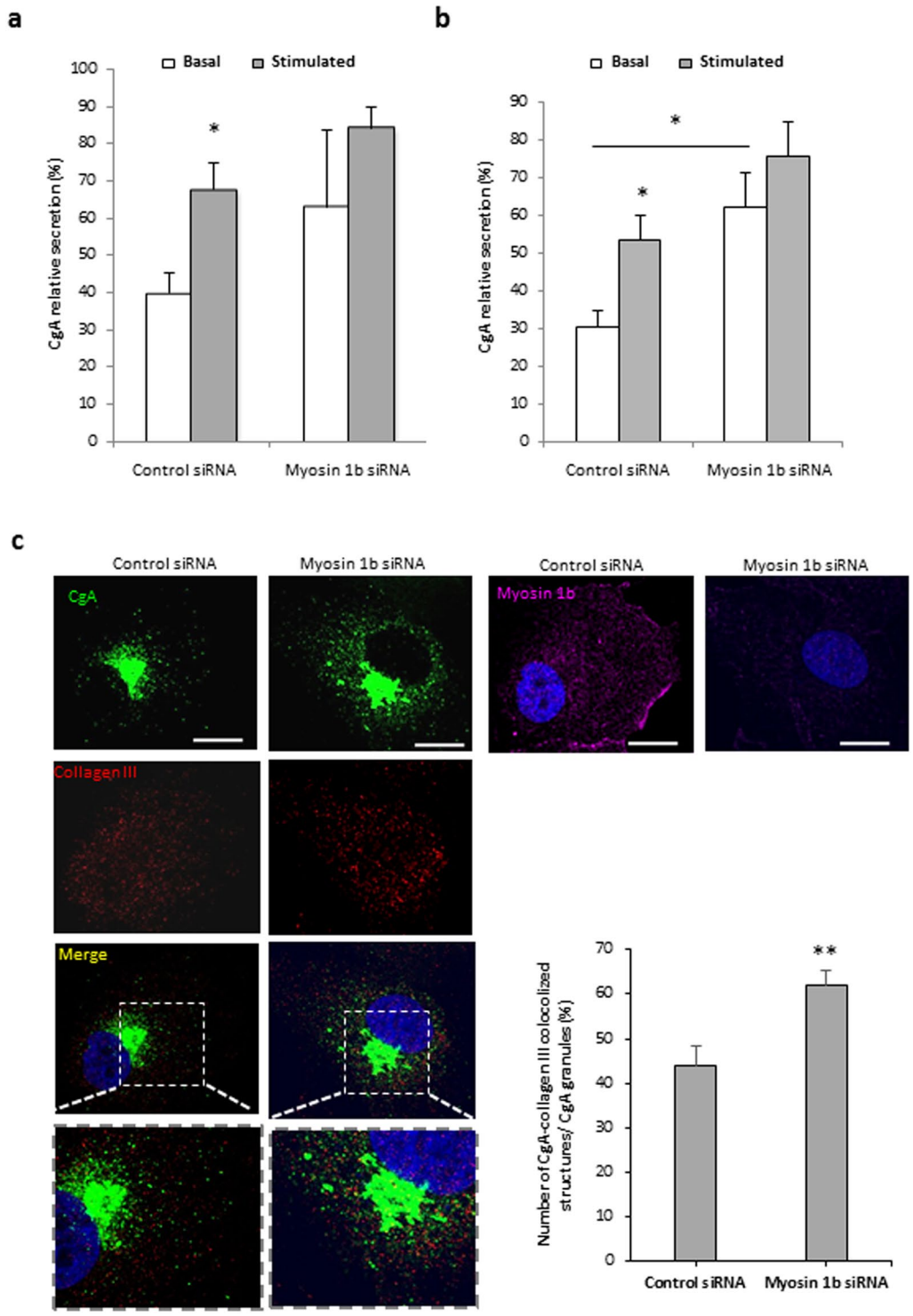


Figure 4. Myosin 1b depletion leads to CgA leakage through the constitutive secretory pathway. Quantification after Western blot analysis of CgA secretion and content from COS7-CgA cells (**a**) and PC12 cells (**b**), transfected with control or myo1b siRNA, in basal or 2 mM Ba^{2+}-stimulated conditions. Normalized CgA release in the medium relative to total CgA (medium + cell content) is determined. The values represent the means ± s.e.m. from four independent experiments. *$P < 0.05$ (Mann-Whitney test). (**c**) COS7 cells were transfected with control siRNA or Myo1b siRNA and with a plasmid encoding CgA-GFP, fixed, immunolabeled with anti-collagen III or Myo1b antibody, and the distribution of CgA was analyzed by confocal microscopy. The scale bar represents 10 µm. The number of CgA-GFP/collagen III colocalized structures in COS7-CgA cells, transfected with control or myosin 1b siRNAs, was quantified and expressed as percentages of CgA/collagen III colocalized structures relative to total CgA granules. The values represent the means ± s.e.m. from three independent experiments (n = 45 cells). **$P < 0.01$ (Student's t-test with Welch's correction).

Name	Access number	Function	References
Actin cytoplasmic 1	P60709	Golgi-derived transport carrier biogenesis and Golgi-to-ER protein transport	25
Actin cytoplasmic 2	P63261		26
Actin related protein 2/3 complex subunit 2	O15144	Associated to actin filaments and involved in TGN budding	6
		TGN budding	27
Cofilin-1	P23528	Signalling pathway that regulates actin assembly in neuronal Golgi membranes.	
Profilin	P35080		28
Secretory carrier membrane protein 3	O14828	Golgi-derived transport carrier biogenesis and Golgi-to-ER protein transport	29

Table 1. F-actin components, effectors and regulators, with known functions at the Golgi complex, identified in the membrane fraction of purified granules from COS7-CgA cells. Identification was based on human sequences, as well as those of other mammalian species. Only proteins that were identified with one or more high scoring peptides from Mascot were considered to be true matches. "High scoring peptides" corresponded to peptides that were above the threshold in Mascot ($P < 0.05$) searches. The table shows a non-redundant list of the proteins and the reference to the Uniprot-access number used in database searches (http://uniprot.org).

Myosin 1b promotes the recruitment of Arp2/3-dependent F-actin to the Golgi area. Myo1b has the ability to interact with actin *via* its motor domain and with the membrane *via* its pleckstrin homology motif[11]. Using Myo1b siRNA and the Arp2/3 inhibitor CK-666, we investigated the impact of Myo1b and Arp2/3 complex on F-actin distribution in the Golgi area of COS7-CgA cells. Fluorescent phalloidin and GM130 antibody allowed the analysis of actin distribution around the Golgi area. Analysis of line scans of fluorescence intensity taken through the cell showed that Myo1b depletion and Arp2/3 inhibition lead to F-actin decrease in the Golgi area (Fig. 7a). Quantification of actin and Golgi complex colocalization showed that both Myo1b knockdown and Arp2/3 complex inhibition lead to a 50% decrease in actin occurrence at the Golgi complex (Fig. 7b). These results show that blockade of Arp2/3 complex phenocopies Myo1b knockdown and that both Myo1b and Arp2/3 complex are involved in the recruitment of F-actin to the Golgi area in secretory cells.

Discussion

Secretory granules are key organelles allowing regulated hormone release in endocrine cells. Although considerable efforts have been devoted to understand the molecular events underlying secretory granule formation, the complex mechanisms that allow the specific sorting of hormones and the budding of secretory granules remain incompletely understood. It has been proposed that the sorting of peptide hormones through the regulated secretory pathway is controlled by chromogranins, which aggregate with peptides in the TGN lumen and function as the core around which budding of secretory granules is initiated from the TGN membrane[14]. In a previous study, we used a simplified model of CgA-induced vesicles in COS7 cells to identify potential effectors of granulogenesis through proteomic analysis of the newly formed granules. This analysis allowed the identification of a panel of cytosolic proteins interacting with actin, including myosins[8], some of which have been associated with vesicular formation and exocytosis. Indeed, we identified myosin VI which is known to be involved in the regulated exocytosis of neuroendocrine cells[9,15,16] and in the maintenance of the Golgi morphology[17]. We also identified Myo1b, which has been shown to have an anchoring role that allows TGN membrane deformation through its attachment to the actin cytoskeleton, leading to the biogenesis of post-Golgi carriers in HeLa cells[6]. A more detailed analysis by mass spectrometry of proteins associated with the membrane of newly formed granules allowed us to identify Arp2/3 complex and actin cytoplasmic 1 and 2, which could act in concert with myosins to regulate the formation of secretory granules in endocrine cells. Although several studies reported the implication of myosins and F-actin in the trafficking and exocytosis of secretory granules[18], the role of these multi-functional proteins in the formation of secretory granules has never been reported. We found that Myo1b is associated with the TGN and immature secretory granules in PC12 cells, indicating that Myo1b could affect the early stages of secretory granule biogenesis by inducing the budding of immature vesicles from the TGN membrane. When Myo1b expression is knocked down, the number of secretory granules is significantly reduced, thus pointing out a possible direct role of this protein in the formation of secretory granules. In addition, time-lapse imaging revealed that Myo1b depletion impacts the dynamics of the formed granules. Since our previous studies showed that constitutive vesicles move faster than CgA-induced granules in COS7 cells[8], our present observations suggest that the absence of Myo1b leads to misrouting of CgA toward the constitutive secretory pathway. In support of this finding, we observed higher basal secretion and a higher number of CgA-containing constitutive vesicles when Myo1b was knocked down. Taken together, these data strongly support a role of Myo1b in the biogenesis of functional secretory granules underlying hormone regulated release in endocrine cells.

In addition to myosins, we found that Arp2/3 complex and F-actin are associated to secretory granule membranes. But more than controlling the integrity of the Golgi complex, F-actin, together with Arp2/3, has been shown to mediate the effect of Myo1b on TGN membrane deformation in HeLa cells, as Myo1b actively tethers and orients polymerizing F-actin to generate the required mechanical force[6]. In the present study, we demonstrate for the first time that F-actin controls the biogenesis of secretory granules, most likely *via* its recruitment to the Golgi region through Arp2/3 activation. Indeed, the Arp2/3 complex binds to actin and was shown here to exert an active role in secretory granule formation, potentially by providing *de novo* actin tracks for membrane curvature, as demonstrated during secretory granule exocytosis[19,20]. Therefore, Myo1b depletion or Arp2/3 inhibition could disrupt the interaction between the TGN membrane and F-actin, hampering secretory granule formation.

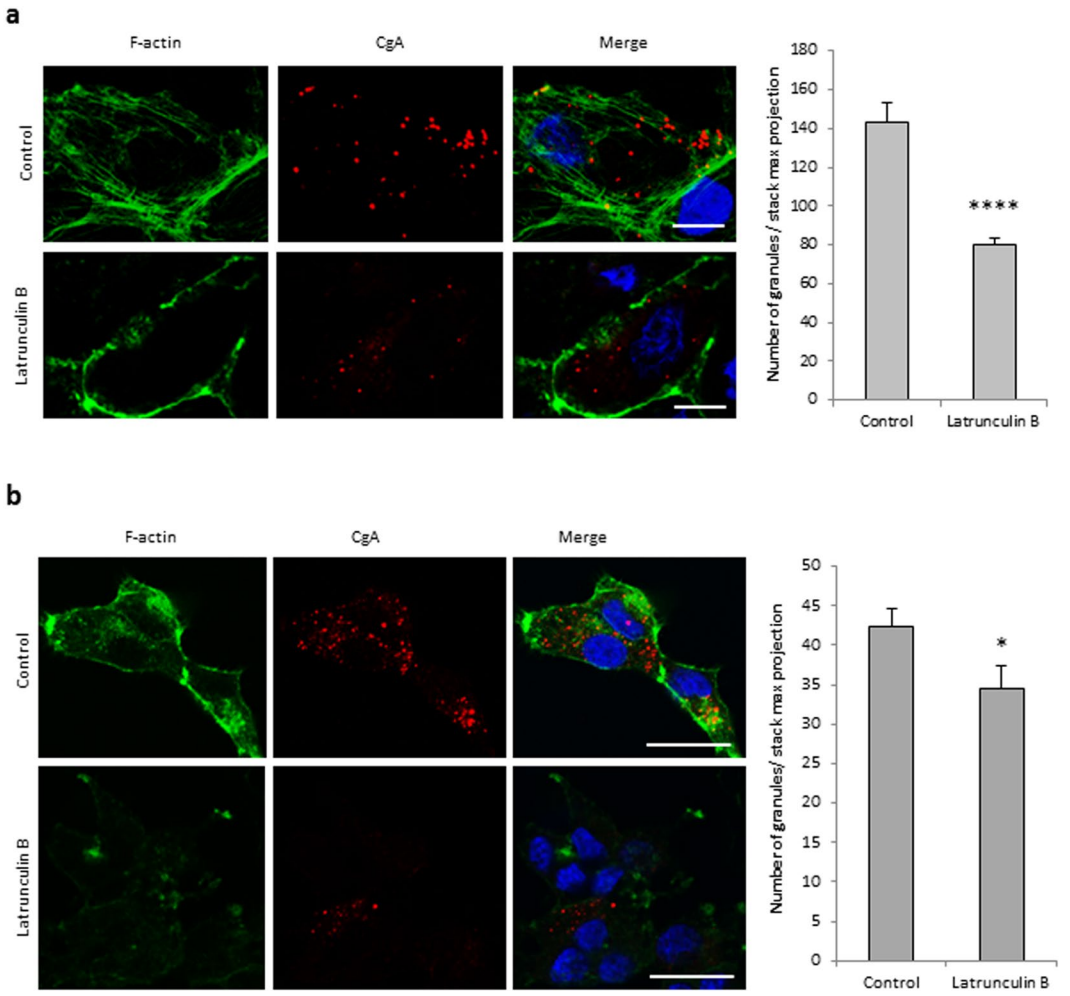


Figure 5. F-actin is required for the biogenesis of secretory granules. COS7-CgA cells (**a**) and PC12 cells (**b**) were treated using DMEM alone (control) or supplemented with latrunculin B. They were labeled with fluorescent phalloidin (F-actin), immunolabeled with anti-CgA antibody and analyzed by confocal microscopy. Projected images of 26 0.3 µm-thick confocal sections throughout the cells are shown. The scale bar represents 20 µm. The number of CgA granules in control and treated cells was quantified and expressed as mean + s.e.m. from three independent experiments (n = 30 cells). *$P < 0.05$, ****$P < 0.0001$ (Mann-Whitney test).

These results suggest that the actomyosin complex could contribute to secretory granule biogenesis by triggering membrane deformation, which could be stabilized in the nascent secretory granule by cytosolic BAR proteins, such as the protein interacting with C kinase 1 or arfaptin-1[21,22], before the recruitment of scission proteins that will give rise to immature secretory granules.

The present work represents the first evidence that Myo1b and F-actin are involved in secretory granule formation and in the establishment of the regulated secretory pathway. The action of the actomyosin complex could require its recruitment at the TGN to induce membrane remodeling, a mandatory process for the biogenesis of secretory granules. Additional studies will be needed to establish the molecular mechanisms promoting the recruitment of actomyosin complex to the TGN membrane in order to trigger secretory granule biogenesis.

Materials and Methods

Cell culture. African green monkey kidney fibroblast-derived COS7 cells (American Type Culture Collection; CRL 1651), wild type (COS7-WT) and stably expressing CgA (COS7-CgA) developed previously[8], were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (Life Technologies), 100 U ml^{-1} penicillin and 100 µg ml^{-1} streptomycin (Life Technologies), and 300 µg ml^{-1} geneticin (G-418 sulfate, Life Technologies) to maintain selection in COS7-CgA cells, at 37 °C in 5% CO_2. Rat pheochromocytoma PC12 cells (American Type Culture Collection; CRL 1721) were routinely grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) supplemented with 5% sterile-filtered fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), 10% sterile-filtered HyClone Donor Equine serum (Thermo Scientific), 100 U ml^{-1} penicillin and 100 µg ml^{-1} streptomycin (Life Technologies), 1% L-glutamine (Life Technologies), at 37 °C in 5% CO_2. Most experiments with PC12 cells were performed on cells plated onto 10 µg ml^{-1} poly-D-lysine (Sigma) coated 15-mm round glass coverslips in 24-well plates. For IF and live experiments, COS7-WT cells were transfected with 0.8 µg of DNA encoding GFP-tagged human CgA (CgA-GFP)[8] and 2 µl Lipofectamine

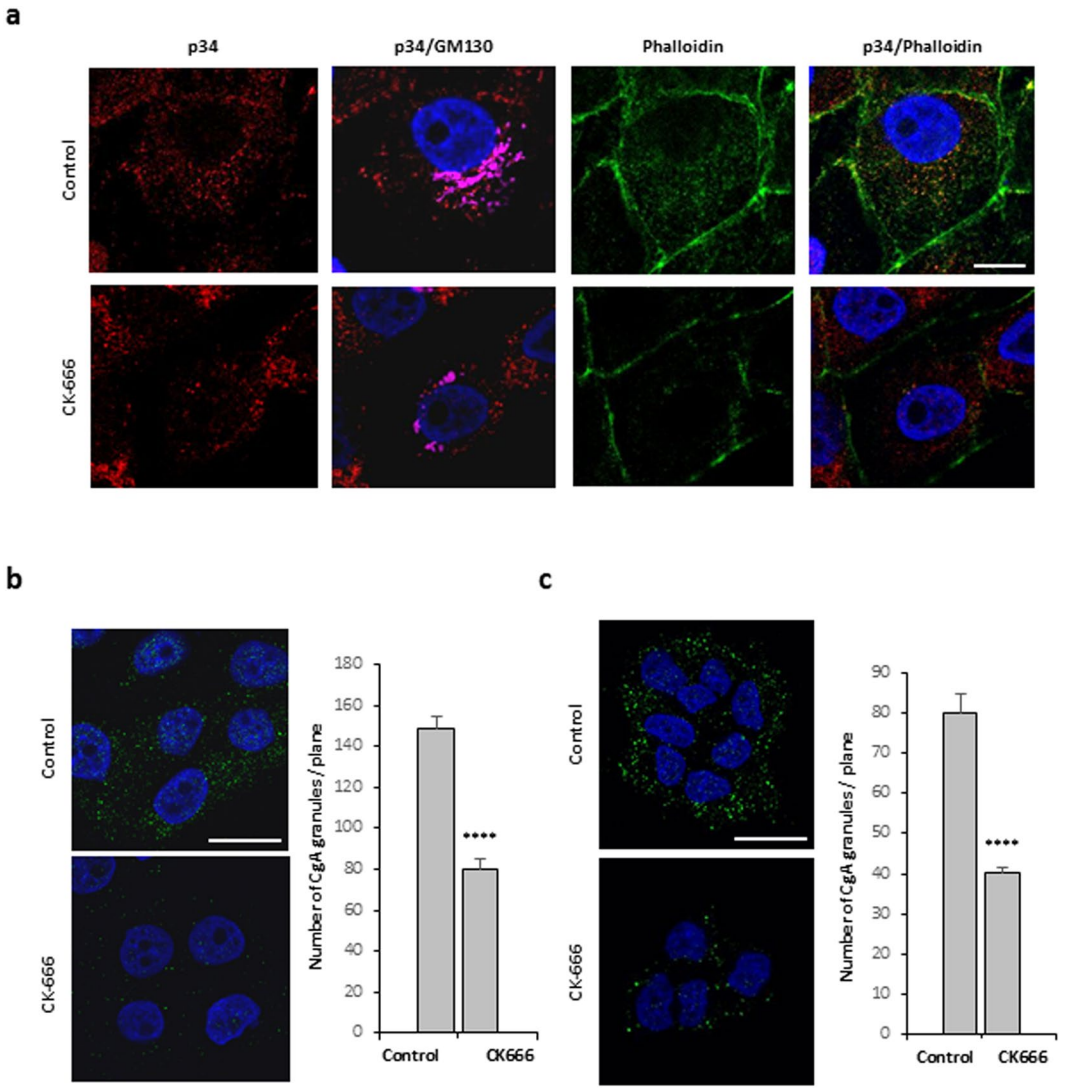


Figure 6. Arp2/3 complex activation is required for the biogenesis of secretory granules. (**a**) COS7-CgA cells were treated with DMSO alone (control) or with the Arp2/3 inhibitor (CK-666). The distribution of the Arp2/3 complex and F-actin was assessed by immunofluorescence with anti-p34 antibody and by fluorescent phalloidin, respectively, and was analyzed by confocal microscopy. A single focal medial plane of GM130 (magenta), p34 (red) and F-actin (green) distribution is shown. Scale bar represents 20 μm. COS7-CgA cells (**b**) and PC12 cells (**c**) were treated with DMSO alone (control) or with the Arp2/3 inhibitor (CK-666). They were immunolabeled with anti-CgA antibody and analyzed by confocal microscopy. Representative confocal microscopy sections throughout the nucleus are shown. The scale bar represents 20 μm. The number of CgA granules in cells treated with DMSO alone (control) or with the Arp2/3 inhibitor (CK-666) was quantified and expressed as mean + s.e.m. from three independent experiments (n = 40 cells). ****$P < 0.0001$ (Student's t -test with Welch's correction).

2000 (Invitrogen) per well (24-well plate or Matteck) according to the manufacturer's protocol. Four or five hours after the beginning of transfection, the culture medium was replaced by supplemented DMEM, and cells were additionally cultured for 24–48 h for IF experiments.

Myosin 1b knockdown. For transient Myo1b knockdown, a home-designed Myo1b siRNA (Myo1bH siRNA, 5′-GCTTACCTGGAAATCAACAAG-3′) (Sigma Proligo) was used as previously described[6]. A non-targeting siRNA pool designed by Dharmacon-Thermo Scientific has been used as control siRNA. The non-targeting pool contains 2 siRNA which respectively reduces EGFR mRNA by ≈50% and targets firefly luciferase. COS7 cells were transfected with 10 nM siRNA and 1 μL of Lipofectamine RNAimax (Life Technologies) per well, in 24-well plate, according to the manufacturer's protocol. PC12 cells were transfected with 30 nM siRNA, following the same protocol. Four hours after the transfection, the medium was replaced by supplemented DMEM, and cells were cultured for 48 h. Transfected cells were then analyzed by SDS-PAGE and Western blotting for Myo1b or CgA levels or fixed for IF.

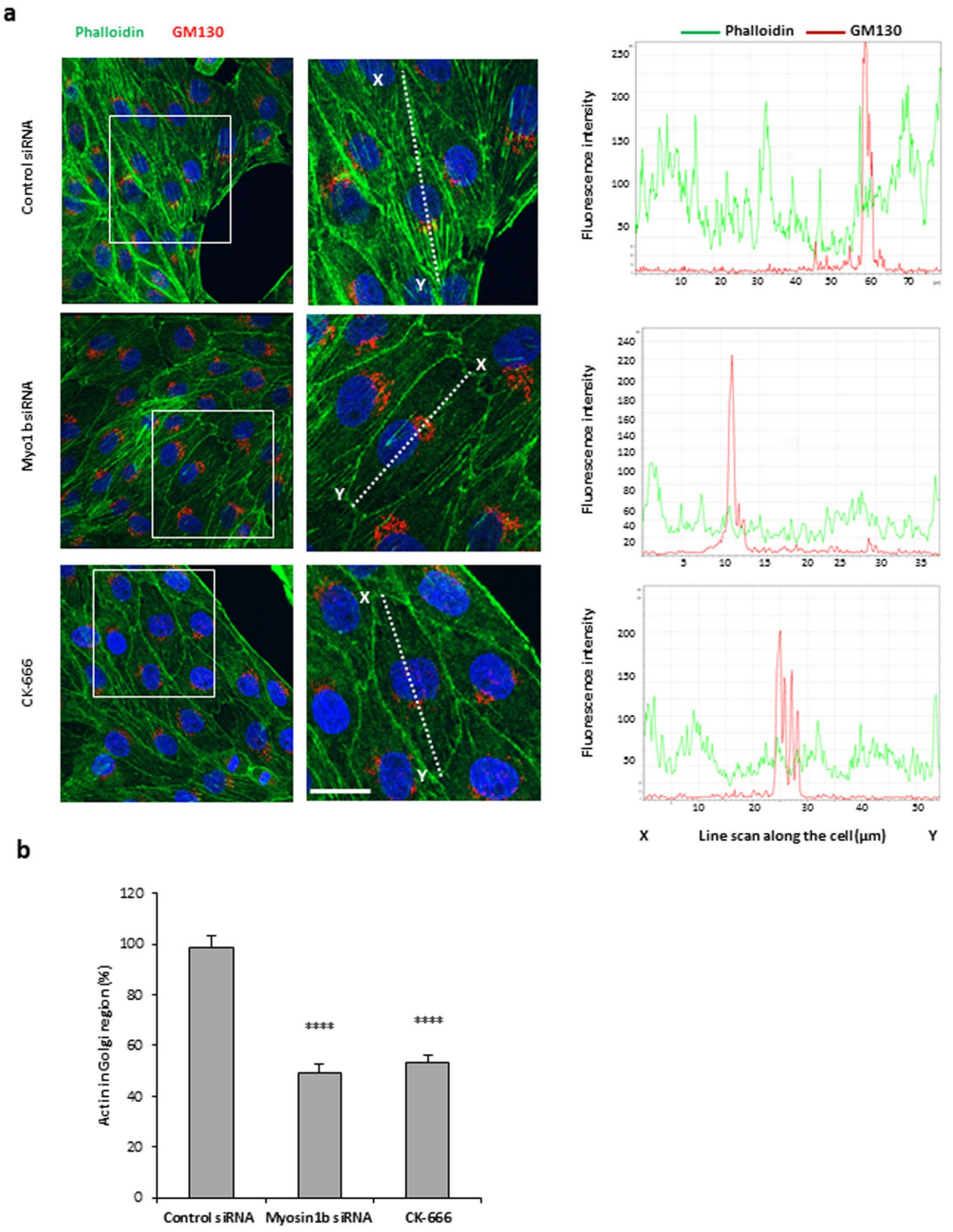


Figure 7. Myosin 1b knockdown and depletion of the Arp2/3 complex reduce F-actin distribution in the Golgi area. (**a**) COS7-CgA cells were either transfected with control siRNA or Myo1b siRNA, or treated with the Arp2/3 inhibitor CK-666. F-actin and the Golgi complex were labeled with fluorescent phalloidin and immunolabelled with GM130 antibody, respectively, and cells were analyzed by confocal microscopy. Projected images of 20 0.3 µm-thick confocal sections throughout the cells are shown. The scale bar represents 20 µm. The fluorescence intensities along the white lines indicated in the merged pictures were quantified using the line scan mode of Leica software. Line scans taken through the cell are plotted in graphs in the right side of the corresponding images. (**b**) The localization of F-actin in the Golgi region was quantified and expressed as mean + s.e.m. from four independent experiments (n = 22 cells). ****$P < 0.0001$ (Student's t -test with Welch's correction).

Drug treatments. Arp2/3 complex was inactivated by incubating cells in DMEM supplemented with 100 µM DMSO-dissolved CK-666 (Sigma-Aldrich) for 1 h at 37 °C, 5% CO_2. Actin filaments were depolymerized by incubating cells in DMEM supplemented with 2.5 µM latrunculin B (Calbiochem, La Jolla, CA) for 45 min at 37 C, 5% CO_2. Under these conditions, microtubules were not significantly affected (data not shown).

Secretion analysis. COS7 cells stably expressing CgA were cultured in 24-well plates, extensively washed with phosphate buffered saline and subsequently incubated in calcium secretion buffer (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl2, 10 mM HEPES, pH 7.4) (basal release of CgA) or in barium secretion buffer (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM BaCl2, 10 mM HEPES, pH 7.4) (stimulated release of CgA) for 15 min, at 37 °C in 5% CO_2. Secretion media were collected, cleared by centrifugation (5 min, 14,000 *g*, 4 °C) and stored in Laemmli buffer for further analysis. Cells were lysed in NP40 cell lysis buffer (Invitrogen) containing protease inhibitor cocktail (Roche), and centrifuged (15 min, 15,000 *g*, 4 °C). Then, proteins from the supernatant were denatured in Laemmli buffer. Secretion media and cell homogenates were analyzed by Western blotting.

Antibodies. Primary antibodies used were monoclonal anti-synaptobrevin 2 (104211 from Synaptic system; 1:5,000); monoclonal α-tubulin (T5168 from Sigma; 1:5,000); rabbit polyclonal anti-CgA (EL-35)[23] (1:500 for IF, 1:1,000 for Western blotting); goat polyclonal anti-CgA (sc-23556 from Santa Cruz Biotechnology inc; 1: 200); rabbit polyclonal anti-Myo1b (HPA 013607 from Sigma prestige antibodies; 1:200 for IF, 1:250 for Western blotting); mouse monoclonal anti-GM130 (610822 from BDBiosciences; 1:1,000); rabbit polyclonal anti-furin (Ab3467 from Abcam; 1:200); sheep polyclonal anti-human TGN46 (AHP500 from AbD serotec; 1:500); rabbit polyclonal anti-p34-Arc/ARPC2 (07-227 from Millipore; 1:400); goat anti-type III collagen (1330-01 from Southern Biotech; 1: 200). For IF, secondary antibodies used were Alexa 488-conjugated donkey anti-rabbit IgG; Alexa 594-conjugated donkey anti-rabbit IgG; Alexa 647-conjugated donkey anti-rabbit IgG; Alexa 488-conjugated donkey anti-mouse IgG; Alexa 488-conjugated donkey anti-goat IgG; Alexa 594-conjugated donkey anti-goat IgG; Alexa 594-conjugated donkey anti-sheep IgG; Alexa 647-conjugated donkey anti-mouse IgG (Invitrogen; 1:500). For Western blotting, anti-rabbit, anti-mouse and anti-goat secondary antibodies conjugated to horseradish peroxydase (Santa Cruz biotechnologies; 1:2,000) were used.

Protein electrophoresis and Western blotting. Cells were harvested by scraping, homogenized, and proteins were separated by SDS-PAGE followed by Western blotting. Membranes were incubated in a blocking buffer containing 5% non-fat dry milk in phosphate-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (Sigma) (PBS-T) for 1 h at room temperature, and overnight with primary antibodies at 4 °C. Then, membranes were washed for 45 min with PBS-T. Blots were subsequently incubated for 1 h with appropriate HRP-conjugated secondary antibody in blocking buffer. Membranes were washed for 45 min with PBS-T. Immunoreactive proteins were detected by chemiluminescence (Pierce Biotechnology). Quantification was performed using ImageJ software (Wayne Rasband National Institutes of Health) and Image Lab software (Bio-Rad). The mean intensity of each individual band of interest was calculated after background value subtraction. For validation of siRNA transfection, values were normalized to the mean intensity of the loading control band for each sample (α-tubulin). For secretion studies, values of released CgA in the medium were normalized to those of total CgA (medium + cell content).

Immunofluorescence labelling. Cells cultured onto coated glass coverslips were transfected as described above and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS at room temperature for 15 min. Cells were permeabilized and blocked for 30 min with 0.3% Triton X-100 in PBS containing normal donkey serum (1:50) and 1% BSA. Cells were then incubated for 2 h at room temperature with primary antibodies, and, after washing with PBS, for 1 h with secondary antibodies. Phalloidin-FITC (Invitrogen, 500 nM) was used to detect actin filaments. Nuclei were stained with DAPI (Molecular probes #D3571, 1 µg ml^{-1}). To verify the specificity of the immunoreactions, the primary or secondary antibodies were substituted with PBS.

Image acquisition. Confocal microscopy was carried out with a TCS-SP8 upright confocal laser scanning microscope equipped with 63× oil immersion objective (NA = 1.4; Leica, Microsystems). Alexa 488 and GFP were excited at 488 nm and observed in a 505–540 nm window. Alexa 594 was excited at 594 nm and observed in a 600–630 nm window. Alexa 647 was excited at 633 nm and observed in a 650–700 nm window. For dual color acquisition, images were sequentially acquired in line scan mode (average line = 2). Overlays were performed with post acquisition Leica Confocal Software functions to obtain the presented snapshots. Golgi exit of granules was monitored by time-lapse fluorescence microscopy using a spinning-disc confocal microscope. This microscopy was carried out with a Yokogawa CSU-22 spinning-disc head on a Nikon TE-2000 U microscope equipped with a 100× NA 1.4 oil immersion objective and a Coolsnap HQ2 camera, a NanoScanZ piezo focusing stage (Prior Scientific) and a motorized scanning stage (Marzhauser). This microscope was steered with Metamorph 7.1 (Universal Imaging Corporation). The fast scan mode at 512 × 512 pixel resolution was used. Video sequences were acquired at 5 frames s^{-1} (100–200 ms exposures).

Post-acquisition analysis. The extent of colocalization of two labels was measured using the "Colocalization" module of Imaris 7.6.5. 64-bit version (Bitplane AG, www.bitplane.com). This program analyzes plan of confocal sections acquired in two channels. Imaris colocalization analyzes the entire confocal plan by measuring the intensity of each label in each pixel. The program uses an iterative procedure to determine an intensity threshold (in the 0–255 scale of pixel intensity) for each of the two labels. Pixels with intensities above this threshold are considered to be above the background. A pixel is defined as having colocalization when the intensities of both labels are above their respective thresholds. The extent of colocalization was expressed by Pearson coefficient in pixels with colocalization. The Pearson coefficient is a number between + 1 and −1, with

positive values indicating a direct correlation, negative values indicating an inverse correlation, and values near 0 indicating no correlation. In this case, the Pearson coefficient measures the correlation between the intensities of the two labels only in the pixels with colocalization. The following procedure was used to measure colocalization. A computer folder containing the stack of confocal sections for the two labels was generated by the Leica TCS-SP8 confocal microscope. This folder was opened with Imaris and converted into an Imaris file. A broad region of interest (ROI) was defined as all the pixels in which the intensity of one of the labels was above a pixel intensity defined in the 0–255 scale. Once the thresholds were set, the program outputs a canal of colocalization with channel statistics containing the Pearson coefficient. Then with the tool 'spots detection' on Imaris, the number of spots in each label (A, B and 'coloc' channel) was quantified to determine the percentage of colocalised granules. Spots statistics are automatically computed for each spot object. To each spot belongs a spatial position along the x- and y-axis, as well as the intensity of the point it represents. The spot object is available to model point-like structures in the data. It provides a procedure to automatically detect point-like structures, an editor to manually correct detection errors, a viewer to visualize the point-like structures as spheres, and statistics output. The rendering of the TGN surface was obtained using the Imaris 'surface' tool.

For the quantification of the number of CgA granules (Figs 2, 3, 5 and 6), the number of objects in the cytoplasm was counted automatically using the Imaris 'spots' function and a size filter (estimated xy diameter) of 0.5 µm. For the quantification of F-actin in the Golgi region, the Golgi region was first outlined on the plane showing more GM130 staining; then F-actin was thresholded and the overlapping pixels between the two structures was calculated with the Imaris 'coloc' function. The distributions of GM130 and F-actin were analysed using post acquisition 'line scan' mode of the Leica Confocal Software. For the analysis of live cell images, each granule in the Golgi area was identified after background correction by ND-Safir software[24] (Inria Rennes). The mean velocity of detected granules was determined using the ImageJ "manual tracking" tool.

Subcellular fractionation. Cells were collected in PBS and sedimented by centrifugation at 400 *g* for 5 min at 4 °C. The cell pellet was disrupted by 5 pull/push through a 21- and then a 25-gauge needles attached to a syringe, in ice-cold buffer (0.32 M sucrose, 20 mM Tris-HCl, pH 8; 1 ml g^{-1} of cells). The resulting lysate was centrifuged at 800 *g* for 30 min at 4 °C. Post-nuclear supernatants were centrifuged at 20,000 *g* for 20 min at 4 °C. Pellets containing dense core granules were centrifuged on a multi-step gradient of 1 to 2.2 M sucrose (1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2 and 2.2 M sucrose; 5 ml steps), at 100,000 *g* for 12 h at 4 °C. All gradient steps were collected from the top of the tube in 5 ml fractions, and analyzed by western blotting to check the granule-containing fractions and to verify their purity. The recovered granule fractions were used for liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry analysis.

Proteomic analysis. The fraction containing CgA granules purified from COS7-CgA cells was diluted in Buffer A (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl and Complete Inhibitors (Roche)). The sample was submitted to two freeze-thaw cycles, sonicated for 1 min in a cold water bath and centrifuged at 50,000 *g* for 1.5 h at 4 °C to separate soluble from insoluble material. In order to precipitate soluble proteins, the soluble fraction was diluted in 4 volumes of cold (−20 °C) acetone and incubated for 4 h at −20 °C before centrifugation at 13,000 *g* for protein precipitation. On the other hand, the pellet containing the insoluble material was carefully washed twice with cold buffer A and incubated in 200 µl of Buffer A containing 1% n-dodecyl-beta-maltoside and 0.4% amidosulfobetaine-14 detergents in order to efficiently solubilize membrane proteins. After 2 h of incubation under soft agitation at 4 °C, the extract was centrifuged for 10 min at 13,000 *g* and the proteins contained in the supernatant were precipitated using standard chloroform/methanol method. Then, proteins were reduced, alkylated and separated by 1D- gel electrophoresis. Finally, proteins were cleaved in gel by trypsin and identified by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.

Statistical analysis. Data were analyzed with the Prism program (GraphPad Software). All secretion experiments were repeated at least four times using the non-parametric Mann-Whitney U test. For the quantification of the number of CgA granules, statistical significance was determined by Student's *t* –test with Welch's correction or Mann-Whitney U test. Values are expressed as means ± s.e.m., and the level of significance is designated in the figure legend as follows: *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$, ****$P < 0.0001$.

References

1. Nyholm, T. K. M. Lipid-protein interplay and lateral organization in biomembranes. *Chem. Phys. Lipids* **189**, 48–55 (2015).
2. Ha, K. D., Clarke, B. A. & Brown, W. J. Regulation of the Golgi complex by phospholipid remodeling enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **1821**, 1078–1088 (2012).
3. Frost, A., Unger, V. M. & De Camilli, P. The BAR domain superfamily: membrane-molding macromolecules. *Cell* **137**, 191–196 (2009).
4. Rao, Y. & Haucke, V. Membrane shaping by the Bin/amphiphysin/Rvs (BAR) domain protein superfamily. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 3983–3993 (2011).
5. Miserey-Lenkei, S. *et al.* Rab and actomyosin-dependent fission of transport vesicles at the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.* **12**, 645–654 (2010).
6. Almeida, C. G. *et al.* Myosin 1b promotes the formation of post-Golgi carriers by regulating actin assembly and membrane remodelling at the trans-Golgi network. *Nat. Cell Biol.* **13**, 779–789 (2011).
7. Gauthier, D. J., Sobota, J. A., Ferraro, F., Mains, R. E. & Lazure, C. Flow cytometry-assisted purification and proteomic analysis of the corticotropes dense-core secretory granules. *Proteomics* **8**, 3848–3861 (2008).
8. Elias, S. *et al.* Chromogranin A induces the biogenesis of granules with calcium- and actin-dependent dynamics and exocytosis in constitutively secreting cells. *Endocrinology* **153**, 4444–4456 (2012).
9. Bond, L. M., Peden, A. A., Kendrick-Jones, J., Sellers, J. R. & Buss, F. Myosin VI and its binding partner optineurin are involved in secretory vesicle fusion at the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell* **22**, 54–65 (2011).
10. Komaba, S. & Coluccio, L. M. Localization of myosin 1b to actin protrusions requires phosphoinositide binding. *J. Biol. Chem.* **285**, 27686–27693 (2010).

11. Coudrier, E. & Almeida, C. G. Myosin 1 controls membrane shape by coupling F-Actin to membrane. *Bioarchitecture* **1**, 230–235 (2011).
12. Yamada, A. *et al*. Catch-bond behaviour facilitates membrane tubulation by non-processive myosin 1b. *Nat Commun* **5**, 3624 (2014).
13. Montero-Hadjadje, M. *et al*. Chromogranin A promotes peptide hormone sorting to mobile granules in constitutively and regulated secreting cells: role of conserved N- and C-terminal peptides. *J. Biol. Chem.* **284**, 12420–12431 (2009).
14. Gondré-Lewis, M. C., Park, J. J. & Loh, Y. P. Cellular mechanisms for the biogenesis and transport of synaptic and dense-core vesicles. *Int Rev Cell Mol Biol* **299**, 27–115 (2012).
15. Majewski, Ł., Sobczak, M. & Redowicz, M. J. Myosin VI is associated with secretory granules and is present in the nucleus in adrenal medulla chromaffin cells. *Acta Biochim. Pol.* **57**, 109–114 (2010).
16. Tomatis, V. M. *et al*. Myosin VI small insert isoform maintains exocytosis by tethering secretory granules to the cortical actin. *J. Cell Biol.* **200**, 301–320 (2013).
17. Sahlender, D. A. *et al*. Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. *J. Cell Biol.* **169**, 285–295 (2005).
18. Meunier, F. A. & Gutiérrez, L. M. Captivating New Roles of F-Actin Cortex in Exocytosis and Bulk Endocytosis in Neurosecretory Cells. *Trends Neurosci.* **39**, 605–613 (2016).
19. Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., Malacombe, M., Way, M. & Bader, M.-F. Regulated exocytosis in neuroendocrine cells: a role for subplasmalemmal Cdc42/N-WASP-induced actin filaments. *Mol. Biol. Cell* **15**, 520–531 (2004).
20. Wen, P. J. *et al*. Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate coordinates actin-mediated mobilization and translocation of secretory vesicles to the plasma membrane of chromaffin cells. *Nat Commun* **2**, 491 (2011).
21. Holst, B. *et al*. PICK1 deficiency impairs secretory vesicle biogenesis and leads to growth retardation and decreased glucose tolerance. *PLoS Biol.* **11**, e1001542 (2013).
22. Gehart, H. *et al*. The BAR domain protein Arfaptin-1 controls secretory granule biogenesis at the trans-Golgi network. *Dev. Cell* **23**, 756–768 (2012).
23. Montero-Hadjadje, M. *et al*. Localization and characterization of evolutionarily conserved chromogranin A-derived peptides in the rat and human pituitary and adrenal glands. *Cell Tissue Res.* **310**, 223–236 (2002).
24. Boulanger, J. *et al*. Patch-based nonlocal functional for denoising fluorescence microscopy image sequences. *IEEE Trans Med Imaging* **29**, 442–454 (2010).
25. Egea, G., Lázaro-Diéguez, F. & Vilella, M. Actin dynamics at the Golgi complex in mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 168–178 (2006).
26. Heimann, K., Percival, J. M., Weinberger, R., Gunning, P. & Stow, J. L. Specific isoforms of actin-binding proteins on distinct populations of Golgi-derived vesicles. *J. Biol. Chem.* **274**, 10743–10750 (1999).
27. von Blume, J. *et al*. Actin remodeling by ADF/cofilin is required for cargo sorting at the trans-Golgi network. *J. Cell Biol.* **187**, 1055–1069 (2009).
28. Camera, P. *et al*. Citron-N is a neuronal Rho-associated protein involved in Golgi organization through actin cytoskeleton regulation. *Nat. Cell Biol.* **5**, 1071–1078 (2003).
29. Mota, L. J., Ramsden, A. E., Liu, M., Castle, J. D. & Holden, D. W. SCAMP3 is a component of the Salmonella-induced tubular network and reveals an interaction between bacterial effectors and post-Golgi trafficking. *Cell. Microbiol.* **11**, 1236–1253 (2009).

Acknowledgements

Proteomic studies were performed on the Proteomics Platform PISSARO (plateau-proteomique.crihan.fr), IRIB, Faculty of Sciences, University of Rouen Normandy, 76821 Mont-Saint-Aignan, France, and in the Department of Medical Sciences of UCLM, Ciudad Real, Spain. Confocal microscopy images were obtained in PRIMACEN (http://www.primacen.fr), the Cell Imaging Platform of Normandy, IRIB, Faculty of Sciences, University of Rouen Normandy, 76821 Mont-Saint-Aignan. This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the University of Rouen Normandy, the Conseil Régional de Normandie and the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Author Contributions

C. Delestre-Delacour and O. Carmon performed and analyzed most of the experiments. F. Laguerre helped to analyze images from live imaging experiments. C. Estay-Ahumada performed biochemical studies on PC12 cells. M. Courel helped with the optimization of siRNA experiments and secretion studies. S. Elias developed the COS7 cell line stably expressing CgA. L. Jeandel helped with the optimization of cell culture and transfection experiments. M. Villar Rayo and J.R. Peinado performed part of proteomic studies and analyzed the related MS experiments. L. Sengmanivong performed image acquisitions on spinning disc-equipped confocal microscope. E. Coudrier and S. Gasman contributed with intellectual input and discussion. Y. Anouar and M. Montero-Hadjadje conceived and designed the experiments, and wrote the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-05617-1

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2017

Check for updates

Received: 13 October 2019 | Accepted: 10 December 2019

DOI: 10.1002/iub.2218

CRITICAL REVIEW

IUBMB LIFE WILEY

Chromogranin A in the early steps of the neurosecretory pathway

Fanny Laguerre | **Youssef Anouar** | **Maité Montero-Hadjadje**

Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM, U1239, Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale de Normandie, Rouen, France

Correspondence
Maité Montero-Hadjadje, Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, Inserm U1239, Université de Rouen, Mont-Saint-Aignan, France.
Email: maite.montero@univ-rouen.fr

Funding information
Fondation pour la Recherche Médicale, Grant/Award Number: DEI20151234424; European Regional Development Funds, Grant/Award Number: ERDF DO-IT2015

Abstract

Chromogranin A (CgA) is a soluble glycoprotein stored with hormones and neuropeptides in secretory granules (SG) of most (neuro)endocrine cells and neurons. Since its discovery in 1967, many studies have reported its structural characteristics, biological roles, and mechanisms of action. Indeed, CgA is both a precursor of various biologically active peptides and a granulogenic protein regulating the storage and secretion of hormones and neuropeptides. This review emphasizes the findings and theoretical concepts around the CgA-linked molecular machinery controlling hormone/neuropeptide aggregation and the interaction of CgA-hormone/neuropeptide aggregates with the *trans*-Golgi membrane to allow hormone/neuropeptide targeting and SG biogenesis. We will also discuss the intriguing alteration of CgA expression and secretion in various neurological disorders, which could provide insights to elucidate the molecular mechanisms underlying these pathophysiological conditions.

KEYWORDS

neurological disorders, secretory granules, *trans*-Golgi network

1 | INTRODUCTION

In metazoans, the nervous and endocrine systems ensure the communication between different tissues at the level of the organism through the release of an arsenal of bioactive molecules which allow the coordination of the various physiological functions. Neurons, neuroendocrine, and endocrine cells secrete neuropeptides or hormones through the regulated secretory pathway (RSP): neuropeptides and hormones are stored in secretory granules (SG) and released after SG fusion with the plasma membrane upon cell stimulation. These organelles are generated by budding from the membrane of the *trans*-Golgi network (TGN), where soluble neuropeptides and hormones are targeted toward SG. Among SG components, granins represent a family of glycoproteins including chromogranin A (CgA) which is the major constituent of SG in neuroendocrine cells. The structural features of CgA, that is, a sequence with a high proportion of acidic amino acids and a high capacity to bind calcium, allow hormone aggregation in low pH and high calcium concentration, conditions found in the TGN lumen (Figure 1a,b).[1] Furthermore, CgA sequence also displays numerous dibasic sites which are recognized by processing enzymes, leading to the formation of biologically active peptides such as vasostatin, pancreastatin, catestatin, WE-14, and serpinin (Figure 1a).[2–6] However, the level of CgA processing is generally low and most of

Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; ALS, amyotrophic lateral sclerosis; Aβ, β-amyloid; CgA, chromogranin A; CgB, chromogranin B; CSF, cerebrospinal fluid; DAG, diacylglycerol; hCgA, human chromogranin A; IP3R, IP3 receptor; PA, phosphatidic acid; RSP, regulated secretory pathway; SG, secretory granule; SgII, secretogranin II; SgIII, secretogranin III; SOD1, superoxide dismutase 1; TGN, *trans*-Golgi network; VS-I, vasostatin I.

© 2019 International Union of Biochemistry and Molecular Biology

CgA is intact upon release,[7] making of CgA a useful diagnostic marker for neuroendocrine tumors and inflammatory diseases.[8,9] At the cellular level, CgA plays a key role in SG biogenesis acting as a chaperone for hormone sorting to the RSP in neuroendocrine cells, and is therefore considered as a "granulogenic" protein.[10–12] Once sorted in SG, CgA remains active, for example, to concentrate catecholamines in order to control hormone release during the exocytotic process.[13] In this review, we will discuss these intracellular roles supporting the crucial function of CgA in the establishment of the RSP in neurosecretory cells, whose understanding could be significant for the design of new therapeutic strategies for diseases related to disturbed secretion. All the molecular actors cooperating with CgA for the establishment of the RSP that will be described in the following sections are summarized in Figure 1b.

2 | CHROMOGRANIN A CONTRIBUTES TO THE BIOGENESIS OF SECRETORY GRANULES IN NEUROSECRETORY CELLS

A pioneering study by Kim et al. demonstrated that CgA is a key factor involved in both SG biogenesis and hormone secretion since down-regulation of CgA expression in the neuroendocrine PC12 cell line by antisense RNAs caused a dramatic loss of SG and impairment of the RSP.[14] Moreover, CgA expression in neuroendocrine AtT20 cells lacking the RSP (6T3 cell line) reestablished a RSP, and CgA expression in the non-endocrine CV-1 fibroblast cell line (which is constitutively devoid of CgA and RSP) induced the formation of CgA-containing vesicles. Other studies have revealed that CgA expression in PC12 cells devoid of a RSP (A35 cell line) or in non-endocrine COS7 cells led to the formation of SG-like vesicles which store co-expressed hormones and release their content upon cell stimulation.[10,15] Furthermore, transgenic mice expressing antisense RNA against CgA and CgA KO mice exhibited a significant reduction in the SG number in chromaffin cells, accompanied by a deregulation of catecholamine secretion.[16,17] Interestingly, the expression of human CgA in the latter model rescued the neuroendocrine phenotype. In another CgA null mice strain, Hendy et al. reported conflicting results since CgA gene ablation had no impact on SG number in chromaffin cells,[18] due to overexpression of other granin family members or to different genetic backgrounds. Indeed, other studies demonstrated the granulogenic role of secretogranin II and chromogranin B (CgB).[19,20] Despite compensatory effects of other granins in granule biogenesis, CgA knockout mice systematically exhibited an elevation of catecholamine levels,[18] suggesting nevertheless a specific role of CgA in the regulation of catecholamine storage and secretion. More recently, a morphological study of chromaffin cell SG from CgA-KO mice revealed a decrease in both the diameter and the volume density, and an increase in the ratio between their size and that of their dense core, implying SG swelling that could be due to increased free catecholamines.[21] Altogether, these observations suggest therefore the existence of a link between CgA expression and the formation of functional SG in neuroendocrine cells. To investigate the precise role of CgA among all granins expressed in a same secretory cell, the Borges's group generated a double CgA/CgB-KO mouse line, and observed that the absence of both granins led to giant SG-like structures with little or no electron dense internal matrix, changes in catecholamine accumulation and in the exocytosis course with a significant reduction of the secretory response in chromaffin cells, indicating an alteration of vesicular catecholamine storage and secretion capacities.[22,23] Recently, SG biogenesis was investigated in hippocampal neurons from CgA/CgB-KO mice and surprisingly, no changes were detected in CgA/CgB-KO neurons which exhibited normal dendritic and axonal length and arborization, synapse density, and synaptic vesicle accumulation, as well as number of secretogranin II (SgII)-positive SGs and exocytotic events.[24] Thus, the granulogenic activity of CgA, as well as its role in neurosecretion maintenance, appear to be cell-dependent and despite the biochemical properties shared between CgA and CgB, CgB is unable to restore SG biogenesis in CgA-deficient PC12 cells (6T3 cells).[25]

3 | CHROMOGRANIN A IS AN INTRAGRANULAR PROTEIN INVOLVED IN HORMONE AGGREGATION AND CALCIUM HOMEOSTASIS

Chromogranin A has been first identified in chromaffin cells when adrenal gland secretion was analyzed after splanchnic nerve stimulation, revealing the presence of this protein in SG at a concentration of about 1800 μM.[26] A structural analysis revealed that, due to CgA global acidity and to TGN lumen high calcium concentrations (10–15 mM) and low pH (5.5–6.5), once transported and stored in this compartment, CgA adopts a coiled-coil structure which promotes the initiation of a core for aggregation nucleation.[12,27] Therefore, CgA is a privileged candidate for facilitating the condensation of soluble molecules in order to avoid SG disruption due to osmotic stress and to maintain SG homeostasis.[28,29] In

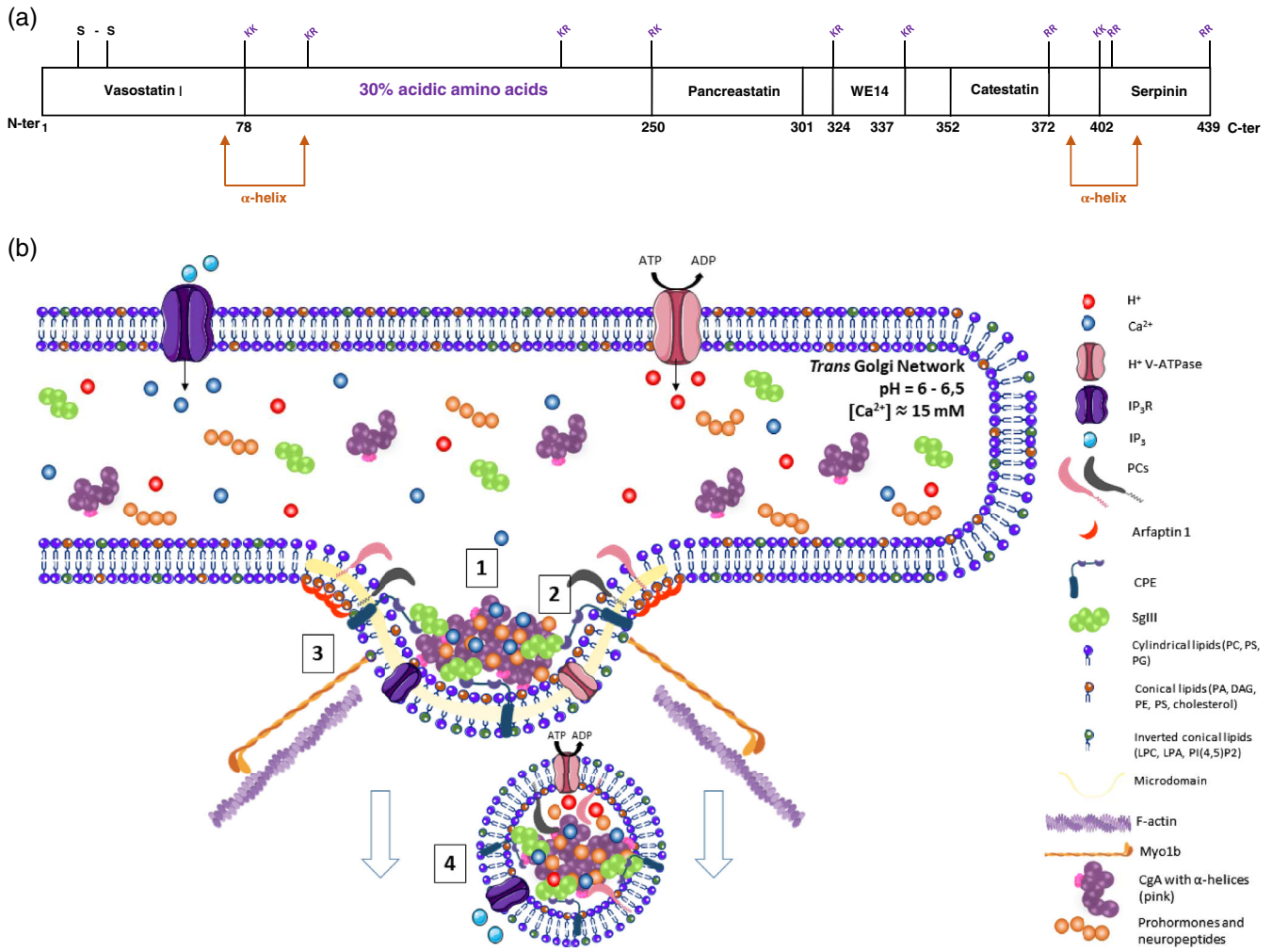


FIGURE 1 Chromogranin A and the molecular mechanism regulating secretory granule formation in the *trans*-Golgi network (TGN). (a) Human chromogranin A (hCgA) precursor, related derived peptides and structural characteristics. S-S, disulfide bond; KK, RR, KR, RK, dibasic cleavage sites. (b) Scheme summarizing the major actors of secretory granule formation from the TGN membrane: (1) in high Ca^{2+} concentration and acidic conditions, provided by H^+-V-ATPases and IP3 receptors (IP3R), chromogranin A (CgA) promotes neuropeptide/hormone aggregation in the TGN lumen; (2) CgA-induced aggregates interact with the TGN membrane through membrane proteins, such as carboxypeptidase E (CPE), secretogranin III (SgIII), prohormone convertases (PCs); (3) resulting molecular remodeling of the TGN membrane, which leads to the formation of a microdomain, enriched with conical lipids and protein-bound CgA aggregates; and (4) recruitment of cytosolic proteins, such as the BAR domain protein Arfaptin 1 and the actomyosin 1b (F-actin and Myo1b) complex, leading to TGN membrane curvature and secretory granule budding

chromaffin cells for instance, the intragranular cocktail is composed of high concentrations of catecholamines and peptides, in addition to large amounts of ATP and Ca^{2+}.[29] Furthermore, a fraction of CgA molecules is associated with SG membrane via the N-terminal region, suggesting that CgA/hormone aggregates might be targeted to SG through CgA interaction with the TGN membrane.[30] The N-terminal part of CgA exhibits a disulfide bridge (Figure 1a) which, in conjunction with the high content in acidic amino acids, has been described to contribute to the aggregation with prohormones at low pH and dissociates from them at pH 7.5.[31–33] Other studies revealed that the C-terminal end of CgA is involved in homodimerization/homotetramerization in TGN lumen conditions,[34] promoting the aggregation-mediated secretion of CgA.[35] Homophilic or heterophilic aggregation is related to the prohormone tertiary conformation which directs specific interactions to generate various SG populations in a same cell type.[12]

In addition, CgA plays a key role in intracellular Ca^{2+} regulation via its interaction with IP3 receptors (IP3R). In a wide variety of secretory cells, SG serve as one of the major IP3-sensitive intracellular Ca^{2+} stores,[28,36] due to the abundance of IP3R/Ca^{2+} channels, granins and up to 40 mM Ca^{2+} concentration (Figure 1b).[37,38] Indeed, SG contain the highest concentrations of all three IP3R types, CgA and CgB in secretory cells,[39,40] with a direct

interaction of CgA with the IP3R/Ca^{2+} channels[41] that increases by eight-fold the open probability of these channels and nine-fold their mean open time.[42,43] Yet, this CgA/IP3Rs interaction depends on the pH milieu, with a binding and IP3R activation only at an intragranular pH of 5.5, and a dissociation at near pH 7.5.[44] This interaction is mediated by the highly conserved CgA amino-terminal region and intraluminal IP3R L3-2 loops.[45,46]

4 | CHROMOGRANIN A INTERACTS WITH THE TGN MEMBRANE TO DIRECT HORMONE AGGREGATES INTO SECRETORY GRANULES

Concerning the hormone sorting process, granin-induced hormone aggregates could interact with the TGN membrane through either sorting receptors or lipids.[47,48] Indeed, a fraction of CgA molecules has been shown to be associated with the SG membrane through the N-terminal region,[30] suggesting that CgA/hormone aggregates may interact with the TGN membrane at lipid-rich microdomains, where proteins are concentrated and act as sorting receptors to secretory granules.[49] Interestingly, Taupenot et al. showed that the N-terminal end of CgA ($hCgA_{77-115}$) contains an amphipathic α helix (Figure 1a) that could be necessary, though perhaps not sufficient, for trafficking CgA into the RSP.[50] Secondary structure prediction algorithms revealed the existence of a second α helix in the C-terminal part of CgA (Figure 1a), suggesting that this region may also act as a targeting motif.[1] It should be noted that certain processing enzymes, such as prohormone convertases PC1/3, PC2, and PC5/6, are also targeted to SG through α helices present in their C-terminal part.[51–53] Moreover, carboxypeptidase E, a prohormone sorting receptor, also interacts with lipid rafts via an amphipathic α helix.[54] Recently, CgB has been shown to be able to penetrate inside biological membranes through its helicoidal domains to form an anion channel.[55] Concerning CgA, several studies showed that the deletion of its N- or C-terminal domains altered its secretion in distinct neuroendocrine cell lines.[10,35,50,56] Interestingly, the sequence identity between vertebrate CgA proteins is restricted to these terminal regions,[57] and expression of frog CgA in non-endocrine COS7 cells also resulted in the biogenesis of CgA-containing granules which release CgA and co-expressed hormones upon stimulation. Deletion of the terminal domains of frog CgA reduced its granulogenic activity and abolished the regulated secretion of cargo proteins in CgA-expressing COS-7 cells and in neuroendocrine AtT20 cells.[15] Thus, since CgA terminal regions contain amphipathic α helices, this study further confirmed that SG biogenesis and hormone sorting depend on CgA interaction with TGN membrane through its conserved helical domains.

Several studies reported that some CgA-derived peptides specifically interact with distinct types of membrane phospholipids. In particular, Helle and colleagues showed that the CgA N-terminal peptide, vasostatin-I (VS-I, $hCgA_{1-78}$), interacts with a membrane model in an amphiphilic penetration manner.[58] VS-I and $hCgA_{47-66}$ may also engage in hydrophobic interaction with membrane phospholipids at physiological conditions, VS-I enhancing the fluidity of saturated species of phosphatidylserine.[59,60] Another CgA-derived peptide named catestatin ($hCgA_{352-372}$) elicits histamine release from rat mast cells via its cationic and amphipathic properties.[61] Thus, these characteristics being analogous to those of microorganism cell-penetrating peptides,[62] both VS-I and catestatin have been postulated to interact with and penetrate into mammalian cells.[7,63] Besides this ability of certain CgA peptides to interact with membrane phospholipids, lipids are key actors in SG budding.[48] Technical developments for membrane lipid analysis, especially mass spectrometry, revealed that the two leaflets of the Golgi membrane display specific composition, with the luminal leaflet enriched in sphingolipids and the cytosolic leaflet in phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine.[64] When these lipids are metabolized by enzymes at the level of the TGN membrane, they generate various products such as diacylglycerol (DAG), phosphatidic acid (PA), and phosphoinositides.[65] Interestingly, the accumulation of PA in the TGN membrane is crucial for SG budding.[66] In the TGN compartment conditions of low pH and high Ca^{2+} concentration, PA adopts a conical shape that favors changes in membrane topology.[67] DAG also exhibits a conical shape and, when accumulated at the TGN membrane, facilitates membrane curvature leading to SG budding.[68] Moreover, in vitro and in vivo studies revealed that cholesterol depletion alters the biogenesis of immature SG from the Golgi,[69,70] and that cholesterol interacts specifically with proteins involved in SG biogenesis such as the vacuolar proton pump V-ATPase[71] and the granin secretogranin III (SgIII).[72] Within neuroendocrine PC12 and AtT20 cell lines, CgA interacts with SgIII, thus allowing the targeting of CgA/hormone aggregates to the RSP.[56,72–74] Interestingly, the authors of these studies also reported that CgA aggregation rate could also influence CgA and prohormone sorting into SG. However, the CgA domain of interaction with SgIII ($hCgA_{41-109}$) is not conserved through evolution, and SgIII is not ubiquitously expressed, suggesting that hormone sorting is probably a cell-dependent process and that various mechanisms

of CgA or other granin-mediated hormone sorting remain to be elucidated. It is possible that granins including CgA could be the triggers that aggregate with other proteins including CPE, PCs, lipids, to initiate SG formation. Furthermore, in a previous study, we demonstrated that CgA expression induces the recruitment of cytoskeleton-, GTP-, and Ca^{2+}-binding proteins at the level of the TGN in order to generate vesicles endowed with typical dynamics and exocytotic properties of neuroendocrine secretory granules in COS7 cells.[75] More recently, we demonstrated that CgA induces the recruitment of the actomyosin 1b complex at the TGN membrane to control SG formation and the associated RSP in neuroendocrine and CgA-expressing COS7 cells.[76] Of note, early studies have reported that AP1-clathrin attachment at the TGN membrane is essential for secretory granule budding although this notion has been debated by others.[77–79] Other studies demonstrated that the cytosolic protein, the BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs) domain protein Arfaptin-1, is recruited at PI(4)P-enriched microdomains of the TGN membrane and allows the sorting of CgA to the RSP in human BON carcinoid tumor cells,[80] and that PKD-mediated Arfaptin-1 phosphorylation is necessary to ensure SG biogenesis in pancreatic β cells.[81] These observations are consistent with previous studies showing that the association of chromogranin-induced prohormone aggregates with TGN membrane rafts is required to stimulate vesicle budding.[82]

5 | NEUROLOGICAL DISEASES AND CHROMOGRANIN A

CgA and other granins have been widely used and investigated as markers of neuroendocrine tumors and the readers are referred to excellent reviews on this topic.[9,45,83] However, only few studies have been devoted to the intriguing expression of CgA in neurological diseases which could be also linked to its aggregatory and secretory properties. For instance, CgA has been reported to accumulate in β-amyloid (Aβ) plaques and to increase in the cerebrospinal fluid (CSF).[84,85] In Alzheimer's disease (AD), the origin of neurofibrillary tangles and Aβ plaques in neurons as well as that of neuron and synapse degeneration leading to a gradual deterioration of memory and cognition are still unclear.[86,87] In this neurodegenerative disease, high levels of CgA are found in the temporal cortex of patients,[88,89] and CgA is found in up to 20% of β-amyloid plaques,[90,91] with CgA-immunoreactive neurites as major components.[92] The high amount of vesicular CgA in dystrophic neurons around Aβ plaques indicates that CgA is of axonal origin and that SG could be involved in Aβ plaque formation. Since axon terminals from pyramidal cortical neurons are devoid of SG,[93] granins are likely located in interneuron SG. Indeed, granin immunoreactive swollen neuritic endings surrounding Aβ plaques originate from interneurons and 40% of CgA-immunoreactive plaques are surrounded and invaded by microglia.[94] Interestingly, CgA has been described as a potent activator of the microglia.[95] Moreover, CgA is likely to be a mediator between neuronal, glial and inflammatory mechanisms found in AD.[96] Furthermore, CSF CgA level is used together with 11 proteins as biomarkers for early AD pathology, to classify disease stage and to monitor pathological progression, thus improving the diagnostic accuracy of Aβ42 peptide and tau protein.[97]

In the progressive neurodegenerative amyotrophic lateral sclerosis (ALS) disease, a loss of neurons in the motor cortex, brainstem, and spinal cord is also accompanied by the development of an inflammation, including microglial infiltration.[98] Superoxide dismutase 1 (SOD1) mutations are found in 20% of patients with ALS and cause motor neuron degeneration.[99] Interestingly, CgA interacts with mutant SOD1 in cultured Neuro2a cells and lysates from spinal cord of ALS mice, acting as a chaperone-like protein to promote mutant SOD1 secretion.[100] In addition, CgA overexpression accelerates ALS onset in SOD1 transgenic mouse model.[99] Moreover, CgA partially co-localizes with SOD1 mutant in human motor neurons.[101]

Furthermore, CgA, like many other presynaptic proteins, is reduced in the prefrontal cortex and in the CSF of schizophrenic patients,[102,103] and CgA level is increased in sera from early schizophrenia patients.[104] The loss of presynaptic membrane proteins found at different stages of exocytosis may result in complex synaptic alterations in specific regions of the hippocampus, with impaired neurotransmitter release in schizophrenic patients.[98] Single nucleotide polymorphism haplotype analysis in the *chga* gene of 633 subjects with schizophrenia revealed an association between the risk of developing schizophrenia and *chga* gene polymorphism in the Japanese population.[103]

Altogether, these data indicate that CgA secretion is altered in a wide spectrum of psychiatric and neurological disorders. The use of CgA as a biomarker for disease diagnosis might be of great potential clinical interest. Besides, further investigation of CgA mechanism of action leading to pathological mechanisms of secretion could contribute to develop therapeutics.

6 | CONCLUSION

Despite the increasing understanding of neurosecretion, the precise molecular mechanisms of SG budding and maturation are still unclear. Regarding the role of CgA,

its importance in SG biogenesis seems to vary depending on neurosecretory cells and other expressed granins. Due to its intrinsic properties and mainly its aggregation ability, CgA allows cargo protein sorting to SG in all the cell models studied. However, the anchoring of CgA-associated cargo proteins to SG seems to result from a less universal process. The investigation of the molecular composition of the microdomains at the level of the TGN membrane which is recognized by CgA-induced aggregates as well as by cytosolic proteins, such as arfaptins and the actomyosin 1b complex, would help to unravel the precise mechanisms of SG biogenesis, transport and exocytosis, and associated neurohormone secretion. Because perturbation in CgA secretion is detected in many neurological and neuroendocrine diseases, CgA should be considered more than only a biomarker and further studies to unravel the molecular mechanisms underlying CgA action have to be encouraged and may allow identifying new therapeutic strategies to correct these neurosecretion dysfunctions.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by institutional funding from INSERM, University of Rouen-Normandie, Région Normandie, the European Regional Development Funds (ERDF DO-IT2015 program; Europe gets involved in Normandie with European Regional Development Fund), and a grant from the Medical Research Foundation (FRM) (project number DEI20151234424) to M.M.-H. F.L. is supported by European Union and Région Normandie fellowship.

ORCID

Maité Montero-Hadjadje https://orcid.org/0000-0001-8859-893X

REFERENCES

1. Elias S, Delestre C, Courel M, Anouar Y, Montero-Hadjadje M. Chromogranin A as a crucial factor in the sorting of peptide hormones to secretory granules. Cell Mol Neurobiol. 2010;30:1189–1195.
2. Aardal S, Helle KB. The vasoinhibitory activity of bovine chromogranin A fragment (vasostatin) and its independence of extracellular calcium in isolated segments of human blood vessels. Regul Pept. 1992;41:9–18.
3. Tatemoto K, Efendić S, Mutt V, et al. Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion. Nature. 1986;324:476–478.
4. Mahata SK, O'Connor DT, Mahata M, et al. Novel autocrine feedback control of catecholamine release. A discrete chromogranin A fragment is a noncompetitive nicotinic cholinergic antagonist. J Clin Invest. 1997;100:1623–1633.
5. Curry WJ, Shaw C, Johnston CF, Thim L, Buchanan KD. Isolation and primary structure of a novel chromogranin A-derived peptide, WE-14, from a human midgut carcinoid tumour. FEBS Lett. 1992;301:319–321.
6. Koshimizu H, Cawley NX, Kim T, Yergey AL, Loh YP. Serpinin: A novel chromogranin A-derived, secreted peptide up-regulates protease nexin-1 expression and granule biogenesis in endocrine cells. Mol Endocrinol. 2011;25:732–744.
7. Helle KB. The chromogranin A-derived peptides vasostatin-I and catestatin as regulatory peptides for cardiovascular functions. Cardiovasc Res. 2010;85:9–16.
8. Di Comite G, Rossi CM, Marinosci A, et al. Circulating chromogranin A reveals extra-articular involvement in patients with rheumatoid arthritis and curbs TNF-alpha-elicited endothelial activation. J Leukoc Biol. 2009;85:81–87.
9. Corti A, Marcucci F, Bachetti T. Circulating chromogranin A and its fragments as diagnostic and prognostic disease markers. Pflugers Arch Eur J Physiol. 2018;470:199–210.
10. Courel M, Rodemer C, Nguyen ST, et al. Secretory granule biogenesis in sympathoadrenal cells. J Biol Chem. 2006;281:38038–38051.
11. Iacangelo AL, Eiden LE. Chromogranin A: Current status as a precursor for bioactive peptides and a granulogenic/sorting factor in the regulated secretory pathway. Regul Pept. 1995;58:65–88.
12. Kim T, Gondré-Lewis MC, Arnaoutova I, Loh YP. Dense-core secretory granule biogenesis. Physiology. 2006;21:124–133.
13. Machado JD, Díaz-Vera J, Domínguez N, et al. Chromogranins A and B as regulators of vesicle cargo and exocytosis. Cell Mol Neurobiol. 2010;30:1181–1187.
14. Kim T, Tao-Cheng JH, Eiden LE, Loh YP. Chromogranin A, an 'on/off' switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. Cell. 2001;106:499–509.
15. Montero-Hadjadje M, Elias S, Chevalier L, et al. Chromogranin A promotes peptide hormone sorting to mobile granules in constitutively and regulated secreting cells: Role of conserved N- and C-terminal peptides. J Biol Chem. 2009;284:12420–12431.
16. Kim T, Zhang C, Sun Z, Wu H, Loh YP. Chromogranin A deficiency in transgenic mice leads to aberrant chromaffin granule biogenesis. J Neurosci. 2005;25:6958–6961.
17. Mahapatra NR, O'Connor DT, Vaingankar SM, et al. Hypertension from targeted ablation of chromogranin A can be rescued by the human ortholog. J Clin Invest. 2005;115:1942–1952.
18. Hendy GN, Li T, Girard M, et al. Targeted ablation of the chromogranin A (Chga) gene: Normal neuroendocrine dense-core secretory granules and increased expression of other granins. Mol Endocrinol. 2006;20:1935–1947.
19. Courel M, Soler-Jover A, Rodriguez-Flores JL, et al. Prohormone secretogranin II regulates dense core secretory granule biogenesis in catecholaminergic cells. J Biol Chem. 2010;285:10030-10043.
20. Obermüller S, Calegari F, King A, et al. Defective secretion of islet hormones in Chromogranin-B deficient mice. PLoS One. 2010;5:e8936.
21. Pasqua T, Mahata S, Bandyopadhyay GK, et al. Impact of Chromogranin A deficiency on catecholamine storage, catecholamine granule morphology and chromaffin cell energy metabolism in vivo. Cell Tissue Res. 2016;363:693–712.
22. Domínguez N, Estévez-Herrera J, Pardo MR, et al. The functional role of chromogranins in exocytosis. J Mol Neurosci. 2012;48:317–322.

23. Díaz-Vera J, Camacho M, Machado JD, et al. Chromogranins A and B are key proteins in amine accumulation, but the catecholamine secretory pathway is conserved without them. FASEB J. 2012;26:430–438.
24. Dominguez N, van Weering JRT, Borges R, Toonen RFG, Verhage M. Dense-core vesicle biogenesis and exocytosis in neurons lacking chromogranins A and B. J Neurochem. 2018; 144:241–254.
25. Kim T, Tao-Cheng J-H, Eiden LE, Loh YP. Large dense-core secretory granule biogenesis is under the control of chromogranin A in neuroendocrine cells. Ann N Y Acad Sci. 2002;971:323–331.
26. Blaschko H, Comline RS, Schneider FH, Silver M, Smith AD. Secretion of a chromaffin granule protein, chromogranin, from the adrenal gland after splanchnic stimulation. Nature. 1967;215:58–59.
27. Mosley CA, Taupenot L, Biswas N, et al. Biogenesis of the secretory granule: Chromogranin A coiled-coil structure results in unusual physical properties and suggests a mechanism for granule core condensation. Biochemistry. 2007;46: 10999–11012.
28. Yoo SH. Secretory granules in inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent Ca^{2+} signaling in the cytoplasm of neuroendocrine cells. FASEB J. 2010;24:653–664.
29. Estevez-Herrera J, Pardo MR, Dominguez N, et al. The role of chromogranins in the secretory pathway. Biomol Concepts. 2013;4:605–609.
30. Kang YK, Yoo SH. Identification of the secretory vesicle membrane binding region of chromogranin A. FEBS Lett. 1997; 404:87–90.
31. Chanat E, Huttner WB. Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the *trans*-Golgi network. J Cell Biol. 1991;115:1505–1519.
32. Thiele C, Huttner WB. The disulfide-bonded loop of chromogranins, which is essential for sorting to secretory granules, mediates homodimerization. J Biol Chem. 1998;273: 1223–1231.
33. Yoo SH. pH-dependent interaction of chromogranin A with integral membrane proteins of secretory vesicle including 260-kDa protein reactive to inositol 1,4,5- trisphosphate receptor antibody. J Biol Chem. 1994;269:12001–12006.
34. Yoo SH, Lewis MS. Dimerization and tetramerization properties of the C-terminal region of chromogranin A: A thermodynamic analysis. Biochemistry. 1993;32:8816–8822.
35. Cowley DJ, Mooret YR, Darling DS, Joyce PBM, Gorr SU. N- and C-terminal domains direct cell type-specific sorting of chromogranin A to secretory granules. J Biol Chem. 2000;275: 7743–7748.
36. Yoo SH. Role of secretory granules in inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent Ca(2+) signaling: From phytoplankton to mammals. Cell Calcium. 2011;50:175–183.
37. Haigh JR, Parris R, Phillips JH. Free concentrations of sodium, potassium and calcium in chromaffin granules. Biochem J. 1989;259:485–491.
38. Winkler H, Westhead E. The molecular organization of adrenal chromaffin granules. Neuroscience. 1980;5: 1803–1823.
39. Huh YH, Jeon SH, Yoo JA, Park SY, Yoo SH. Effects of chromogranin expression on inositol 1,4,5-trisphosphate-induced intracellular Ca2+ mobilization. Biochemistry. 2005; 44:6122–6132.
40. Huh YH, Yoo JA, Bahk SJ, Yoo SH. Distribution profile of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms in adrenal chromaffin cells. FEBS Lett. 2005;579:2597–2603.
41. Yoo SH, Oh YS, Kang MK, et al. Localization of three types of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca(2+) channel in the secretory granules and coupling with the Ca(2+) storage proteins chromogranins A and B. J Biol Chem. 2001;276: 45806–45812.
42. Thrower EC, Park HY, So SH, Yoo SH, Ehrlich BE. Activation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by the calcium storage protein chromogranin A. J Biol Chem. 2002;277: 15801–15806.
43. Yoo SH, Jeon CJ. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca2+ channel modulatory role of chromogranin A, a Ca2+ storage protein of secretory granules. J Biol Chem. 2000;275:15067–15073.
44. Yoo SH, So SH, Kweon HS, et al. Coupling of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and chromogranins A and B in secretory granules. J Biol Chem. 2000;275:12553–12559.
45. Bartolomucci A, Possenti R, Mahata SK, et al. The extended granin family: Structure, function, and biomedical implications. Endocr Rev. 2011;32:755–797.
46. Fan G, Baker ML, Wang Z, et al. Gating machinery of InsP3R channels revealed by electron cryomicroscopy. Nature. 2015; 527:336–341.
47. Loh YP, Kim T, Rodriguez YM, Cawley NX. Secretory granule biogenesis and neuropeptide sorting to the regulated secretory pathway in neuroendocrine cells. J Mol Neurosci. 2004;22:63–72.
48. Tanguy E, Carmon O, Wang Q, et al. Lipids implicated in the journey of a secretory granule: From biogenesis to fusion. J Neurochem. 2016;137:904–912.
49. Zhang C-F, Dhanvantari S, Lou H, Loh YP. Sorting of carboxypeptidase E to the regulated secretory pathway requires interaction of its transmembrane domain with lipid rafts. Biochem J. 2003;369:453–460.
50. Taupenot L, Harper KL, Mahapatra NR, et al. Identification of a novel sorting determinant for the regulated pathway in the secretory protein chromogranin A. J Cell Sci. 2002;115: 4827–4841.
51. Jutras I, Seidah NG, Reudelhuber TL. A predicted α-helix mediates targeting of the proprotein convertase PC1 to the regulated secretory pathway. J Biol Chem. 2000;275: 40337–40343.
52. Dikeakos JD, Mercure C, Lacombe M-J, Seidah NG, Reudelhuber TL. PC1/3, PC2 and PC5/6A are targeted to dense core secretory granules by a common mechanism. FEBS J. 2007;274:4094–4102.
53. Dikeakos JD, Di Lello P, Lacombe MJ, et al. Functional and structural characterization of a dense core secretory granule sorting domain from the PC1/3 protease. Proc Natl Acad Sci. 2009;106:7408–7413.
54. Dhanvantari S, Arnaoutova I, Snell CR, et al. Carboxypeptidase E, a prohormone sorting receptor, is anchored to secretory granules via a C-terminal transmembrane insertion. Biochemistry. 2002;41:52–60.
55. Yadav GP, Zheng H, Yang Q, et al. Secretory granule protein chromogranin B (CHGB) forms an anion channel in membranes. Life Sci Alliance. 2018;1:e201800139.

56. Hosaka M, Watanabe T, Sakai Y, Uchiyama Y, Takeuchi T. Identification of a chromogranin A domain that mediates binding to secretogranin III and targeting to secretory granules in pituitary cells and pancreatic beta-cells. Mol Biol Cell. 2002;13:3388–3399.
57. Montero-Hadjadje M, Vaingankar S, Elias S, et al. Chromogranins A and B and secretogranin II: Evolutionary and functional aspects. Acta Physiol (Oxf). 2008;192:309–324.
58. Maget-Dana R, Metz-Boutigue M-H, Helle KB. The N-terminal domain of chromogranin A (CgA1-40) interacts with monolayers of membrane lipids of fungal and mammalian compositions. Ann N Y Acad Sci. 2002;971:352–354.
59. Blois A, Holmsen H, Martino G, et al. Interactions of chromogranin A-derived vasostatins and monolayers of phosphatidylserine, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. Regul Pept. 2006;134:30–37.
60. Dondossola E, Gasparri A, Bachi A, et al. Role of vasostatin-1 C-terminal region in fibroblast cell adhesion. Cell Mol Life Sci. 2010;67:2107–2118.
61. Krüger P-G, Mahata SK, Helle KB. Catestatin (CgA344-364) stimulates rat mast cell release of histamine in a manner comparable to mastoparan and other cationic charged neuropeptides. Regul Pept. 2003;114:29–35.
62. Metz-Boutigue M-H, Helle K, Aunis D. The innate immunity: Roles for new antifungal and antibacterial peptides secreted by chromaffin granules from the adrenal medulla. Curr Med Chem Endocr Metab Agents. 2004;4:169–177.
63. Helle KB, Corti A, Metz-Boutigue MH, Tota B. The endocrine role for chromogranin A: A prohormone for peptides with regulatory properties. Cell Mol Life Sci. 2007;64:2863–2886.
64. Van Meer G, de Kroon AIPM. Lipid map of the mammalian cell. J Cell Sci. 2011;124:5–8.
65. Ha KD, Clarke BA, Brown WJ. Regulation of the Golgi complex by phospholipid remodeling enzymes. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 2012;1821:1078–1088.
66. Siddhanta A, Shields D. Secretory vesicle budding from the *trans*-Golgi network is mediated by phosphatidic acid levels. J Biol Chem. 1998;273:17995–17998.
67. Kooijman EE, Chupin V, de Kruijff B, Burger KNJ. Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. Traffic. 2003;4:162–174.
68. Asp L, Kartberg F, Fernandez-Rodriguez J, et al. Early stages of Golgi vesicle and tubule formation require diacylglycerol. Mol Biol Cell. 2009;20:780–790.
69. Gondré-Lewis MC et al. Abnormal sterols in cholesterol-deficiency diseases cause secretory granule malformation and decreased membrane curvature. J Cell Sci. 2006;119:1876–1885.
70. Dhanvantari S, Loh YP. Lipid raft association of carboxypeptidase E is necessary for its function as a regulated secretory pathway sorting receptor. J Biol Chem. 2000;275:29887–29893.
71. Thiele C, Hannah MJ, Fahrenholz F, Huttner WB. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. Nat Cell Biol. 2000;2:42–49.
72. Hosaka M, Watanabe T, Sakai Y, Kato T, Takeuchi T. Interaction between secretogranin III and carboxypeptidase E facilitates prohormone sorting within secretory granules. J Cell Sci. 2005;118:4785–4795.
73. Hosaka M, Suda M, Sakai Y, et al. Secretogranin III binds to cholesterol in the secretory granule membrane as an adapter for chromogranin A. J Biol Chem. 2004;279:3627–3634.
74. Han L, Suda M, Tsuzuki K, et al. A large form of secretogranin III functions as a sorting receptor for chromogranin A aggregates in PC12 cells. Mol Endocrinol. 2008;22:1935–1949.
75. Elias S, Delestre C, Ory S, et al. Chromogranin A induces the biogenesis of granules with calcium- and actin-dependent dynamics and exocytosis in constitutively secreting cells. Endocrinology. 2012;153:4444–4456.
76. Delestre-Delacour C, Carmon O, Laguerre F, et al. Myosin 1b and F-actin are involved in the control of secretory granule biogenesis. Sci Rep. 2017;7:5172.
77. Tooze J, Tooze SA. Clathrin-coated vesicular transport of secretory proteins during the formation of ACTH-containing secretory granules in AtT20 cells. J Cell Biol. 1986;103:839–850.
78. Orci L, Ravazzola M, Amherdt M, Louvard D, Perrelet A. Clathrin-immunoreactive sites in the Golgi apparatus are concentrated at the trans pole in polypeptide hormone-secreting cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985;82:5385–5389.
79. Teuchert M, Schäfer W, Berghöfer S, et al. Sorting of furin at the *trans*-Golgi network. Interaction of the cytoplasmic tail sorting signals with AP-1 Golgi-specific assembly proteins. J Biol Chem. 1999;274:8199–8207.
80. Cruz-Garcia D, Ortega-Bellido M, Scarpa M, et al. Recruitment of arfaptins to the *trans*-Golgi network by PI(4)P and their involvement in cargo export. EMBO J. 2013;32:1717–1729.
81. Gehart H, Goginashvili A, Beck R, et al. The BAR domain protein Arfaptin-1 controls secretory granule biogenesis at the *trans*-Golgi network. Dev Cell. 2012;23:756–768.
82. Gondré-Lewis MC, Park JJ, Loh YP. Cellular mechanisms for the biogenesis and transport of synaptic and dense-core vesicles. Int Rev Cell Mol Biol. 2012;299:27–115.
83. Mahata SK, Corti A. Chromogranin A and its fragments in cardiovascular, immunometabolic, and cancer regulation. Ann N Y Acad Sci. 2019;1455:34–58.
84. Duits FH, Brinkmalm G, Teunissen CE, et al. Synaptic proteins in CSF as potential novel biomarkers for prognosis in prodromal Alzheimer's disease. Alzheimers Res Ther. 2018;10:5.
85. Verde F, Steinacker P, Oeckl P, et al. Chromogranin A levels in the cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiol Aging. 2018;67:21–22.
86. Jellinger KA, Bancher C. Neuropathology of Alzheimer's disease: A critical update. J Neural Transm Suppl. 1998;54:77–95.
87. Arendt T. Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol. 2009;118:167–179.
88. Weiler R, Lassmann H, Fischer P, Jellinger K, Winkler H. A high ratio of chromogranin A to synaptin/synaptophysin is a common feature of brains in Alzheimer and pick disease. FEBS Lett. 1990;263:337–339.
89. Lassmann H, Weiler R, Fischer P, et al. Synaptic pathology in Alzheimer's disease: Immunological data for markers of synaptic and large dense-core vesicles. Neuroscience. 1992;46:1–8.
90. Munoz DG. Chromogranin A-like immunoreactive neurites are major constituents of senile plaques. Lab Invest. 1991;64:826–832.

91. Yasuhara O, Kawamata T, Aimi Y, McGeer EG, McGeer PL. Expression of chromogranin A in lesions in the central nervous system from patients with neurological diseases. Neurosci Lett. 1994;170:13–16.
92. Marksteiner J, Kaufman WA, Gurka P, Humpel C. Synaptic proteins in Alzheimer's disease. J Mol Neurosci. 2002;18: 53–64.
93. Torrealba F, Carrasco MA. A review on electron microscopy and neurotransmitter systems. Brain Res Rev. 2004;47:5–17.
94. Lechner T, Adlassnig C, Humpel C, et al. Chromogranin peptides in Alzheimer's disease. Exp Gerontol. 2004;39:101–113.
95. Ciesielski-Treska J, Ulrich G, Chasserot-Golaz S, et al. Mechanisms underlying neuronal death induced by chromogranin A-activated microglia. J Biol Chem. 2001;276:13113–13120.
96. Heneka MT, O'Banion MK, Terwel D, Kummer MP. Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. J Neural Transm. 2010;117:919–947.
97. Perrin RJ, Craig-Schapiro R, Malone JP, et al. Identification and validation of novel cerebrospinal fluid biomarkers for staging early Alzheimer's disease. PLoS One. 2011;6:e16032.
98. Willis M, Leitner I, Jellinger KA, Marksteiner J. Chromogranin peptides in brain diseases. J Neural Transm. 2011;118:727–735.
99. Ezzi SA, Larivière R, Urushitani M, Julien J-P. Neuronal overexpression of chromogranin A accelerates disease onset in a mouse model of ALS. J Neurochem. 2010;115:1102–1111.
100. Urushitani M, Sik A, Sakurai T, et al. Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. Nat Neurosci. 2006;9: 108–118.
101. Schrott-Fischer A, Bitsche M, Humpel C, et al. Chromogranin peptides in amyotrophic lateral sclerosis. Regul Pept. 2009; 152:13–21.
102. Landén M, Grenfeldt B, Davidsson P, et al. Reduction of chromogranin A and B but not C in the cerebrospinal fluid in subjects with schizophrenia. Eur Neuropsychopharmacol. 1999;9:311–315.
103. Takahashi N, Ishihara R, Saito S, et al. Association between chromogranin A gene polymorphism and schizophrenia in the Japanese population. Schizophr Res. 2006;83:179–183.
104. Guest PC, Wang L, Harris LW, et al. Increased levels of circulating insulin-related peptides in first-onset, antipsychotic naïve schizophrenia patients. Mol Psychiatry. 2010;15: 118–119.

How to cite this article: Laguerre F, Anouar Y, Montero-Hadjadje M. Chromogranin A in the early steps of the neurosecretory pathway. *IUBMB Life*. 2020;72:524–532. https://doi.org/10.1002/iub.2218

Chromogranins as Molecular Coordinators at the Crossroads between Hormone Aggregation and Secretory Granule Biogenesis

O. Carmon, F. Laguerre, L. Jeandel, Y. Anouar, and M. Montero-Hadjadje

Abstract Chromogranins are members of a family of soluble glycoproteins sharing common structural features and properties, known to be inducers of prohormone aggregation and sorting into secretory granules. There is now increasing evidence for a key role of chromogranins in hormone sorting to the regulated secretory pathway, resulting from the interaction of chromogranin-induced aggregates with the TGN membrane through either sorting receptors such as carboxypeptidase E, or lipids such as cholesterol. These molecular interactions would contribute to the TGN membrane remodeling, a prerequisite to the recruitment of cytosolic proteins inducing membrane curvature and consecutive secretory granule budding. The identification of the molecular cues involved in the biogenesis of secretory granules is currently under intense investigation. The diversity of chromogranins sharing common structural features but with possible non-redundant functions implies a variety of secretory granule populations whose existence and function remain to be established in a given neuroendocrine cell type.

The present chapter deals with the role of the different members of the chromogranin family in the processes of hormone aggregation, secretory granule biogenesis, and hormone sorting through their interaction with the TGN membrane. Finally, the alteration of chromogranin secretion is described in pathophysiological conditions linked to dysregulated hormone secretion.

1 Introduction

The production and release of neurohormones by neuroendocrine cells are crucial for the coordination of the physiological functions governing organisms. Neurohormones are molecular mediators that are stored in vesicular organelles, called secretory granules, generated by budding of the trans-Golgi network (TGN)

O. Carmon • F. Laguerre • L. Jeandel • Y. Anouar (✉) • M. Montero-Hadjadje
Inserm U1239, University of Rouen-Normandy, UNIROUEN, Institute for Research and Innovation in Biomedicine, Mont-Saint-Aignan, France
e-mail: youssef.anouar@univ-rouen.fr

© Springer International Publishing AG 2017

T. Angelone et al. (eds.), *Chromogranins: from Cell Biology to Physiology and Biomedicine*, UNIPA Springer Series, DOI 10.1007/978-3-319-58338-9_3

membrane. The predominant components found in secretory granules are chromogranins including chromogranin A (CgA), chromogranin B (CgB) also named secretogranin I (SgI), secretogranin II (SgII), SgIII, 7B2 (SgV), NESP55 (SgVI), VGF (SgVII), and proSAAS (SgVIII), which constitute a family of soluble phospho-glycoproteins with similar structural features that confer to these proteins common functional attributes in the biogenesis of secretory granules and the sorting of prohormones. Indeed, chromogranins exhibit a high proportion of acidic amino acids and a high capacity to bind calcium, which support their ability to aggregate with each other and with neuropeptides in the low pH and high calcium conditions found in the TGN (Elias et al. 2010). Chromogranins also exhibit several dibasic sites which are the targets of processing enzymes, leading to the formation of biologically active peptides (Metz-Boutigue et al. 1993; Montero-Hadjadje et al. 2008) but also acting as sorting receptors for chromogranin-induced aggregates in order to direct them to secretory granules (Elias et al. 2010). These proteins are also able to concentrate catecholamines inside the secretory granules to control their release during the exocytotic process (Machado et al. 2010). In this chapter, we will provide a brief update on the central role of chromogranins in the concomitant molecular phenomena involved in the formation of secretory granules (molecular aggregation, sorting of hormone aggregates and budding of the TGN membrane) and leading to the establishment of the regulated secretory pathway in neuroendocrine cells.

2 I/ The Twenty-First Century, the Advent of Chromogranins as Critical Regulators of Secretory Granule Biogenesis

To date, several members of the chromogranin family are known to play an active role in the formation of secretory granules. The pioneer study was performed using an antisens RNA strategy to knockdown CgA expression in neuroendocrine PC12 cells, which showed a drastic reduction of secretory granule number (Kim et al. 2001). Following this initial observation, two strains of CgA knockout mice were generated which diverged for the outcome of secretory granules but which both exhibited hypertension due to an increase in circulating catecholamine levels (Mahapatra et al. 2005, Hendy et al. 2006). These data suggested therefore the existence of a link between CgA expression and the biogenesis of functional secretory granules. Interestingly, disruption of the CgB gene in mice revealed a similar phenotype in pancreatic and chromaffin cells regarding the secretory granule number, with a defective secretion of islet hormones and catecholamines (Obermüller et al. 2010, Díaz-Vera et al. 2010). Similarly, knockdown of SgII expression leads to a decrease in the number of secretory granules in PC12 cells (Courel et al. 2010).

Genetic ablation of SgIII in mice caused no apparent defects despite the ubiquitous expression of SgIII in neuroendocrine cells and tissues (Kingsley et al. 1990). In SgIII-deficient AtT20 cells, the intracellular retention of CgA and proopiomelanocortin (POMC) were impaired, but residual adrenocorticotropic hormone (ACTH)/POMC together with SgII were still localized to the remaining secretory granules, and were secreted in a regulated manner (Sun et al. 2013). The role of a less known member of the chromogranin family, VGF, in secretory granule biogenesis has been investigated more recently (Fargali et al. 2014). In this study, VGF-knockout mice exhibited decreased secretory granule size in noradrenergic chromaffin cells, decreased adrenal CgB and increased plasma epinephrine leading to hypertension, while knock-in of human VGF1–615 rescued the hypertensive knockout phenotype. Interestingly, knock-in of human VGF1–524, that lacks C-terminal peptide TLQP-21, resulted in a significant increase in blood pressure and infusion of TLQP-21 normalized hypertension. Together, these studies indicate that chromogranins and chromogranin-derived peptides may have redundant and non-redundant roles in the regulated secretory pathway, and in the regulation of catecholamine levels and blood pressure.

3 II/ Hormone Aggregation as the First Function Assigned to Chromogranins

After their biosynthesis in the rough endoplasmic reticulum, chromogranins are transported and stored as soluble glycoproteins in the TGN lumen which exhibits high calcium concentration (10–15 mM) and low pH (6–6.5) (Kim et al. 2006). Chromogranins share several structural properties that are conserved during evolution, such as global acidity that enables them to bind calcium with low affinity and high capacity (Taupenot et al. 2003). A structural analysis of CgA revealed that in the conditions of the TGN lumen, CgA can adopt a coiled-coil structure which promotes the initiation of a core for aggregate nucleation (Mosley et al. 2007). Besides, CgA and CgB exhibit a N-terminal disulfide-bonded loop which has been shown to contribute to the aggregation with prohormones at low pH (Chanat and Huttner 1991, Thiele and Huttner 1998). On the other hand, the C-terminal domain of CgA is involved in calcium/pH-dependent homodimerization/homotetramerization (Yoo and Lewis 1993), allowing the aggregation-mediated sorting of CgA to secretory granules (Cowley et al. 2000). These aggregates of high molecular weight sort away prohormones from constitutively secreted proteins (Dannies 2001). Homophilic or heterophilic aggregation is related to the tertiary conformation of the prohormones which direct specific interactions to give rise to various secretory granule populations in a same cell type (Kim et al. 2006).

4 III/ Hormone Sorting through Interaction of Chromogranins with the TGN Membrane

Concomitant to the process of hormone aggregation, chromogranin-induced aggregates interact with the TGN membrane through either sorting receptors or lipids (Fig. 1a). Indeed, secretogranin III (SgIII) interacts with cholesterol in lipid rafts (Hosaka et al. 2004) and with the modifying enzyme and membrane-associated carboxypeptidase E (CPE) (Hosaka et al. 2005). Since CgA has been shown to bind to SgIII (Hosaka et al. 2002), SgIII-cholesterol interaction results in the sorting of CgA-induced aggregates to the granules of the regulated secretory pathway. A recent work by Sun et al. (2013) has suggested a role for SgII as a protein with potential for sorting POMC, suggesting that endocrine cells may have developed a system of redundancy with multiple sorting systems that can partially or completely compensate for each other with the ultimate capacity of ensuring hormone delivery, as also proposed for CPE and SgIII in CgA and POMC sorting (Cawley et al. 2016).

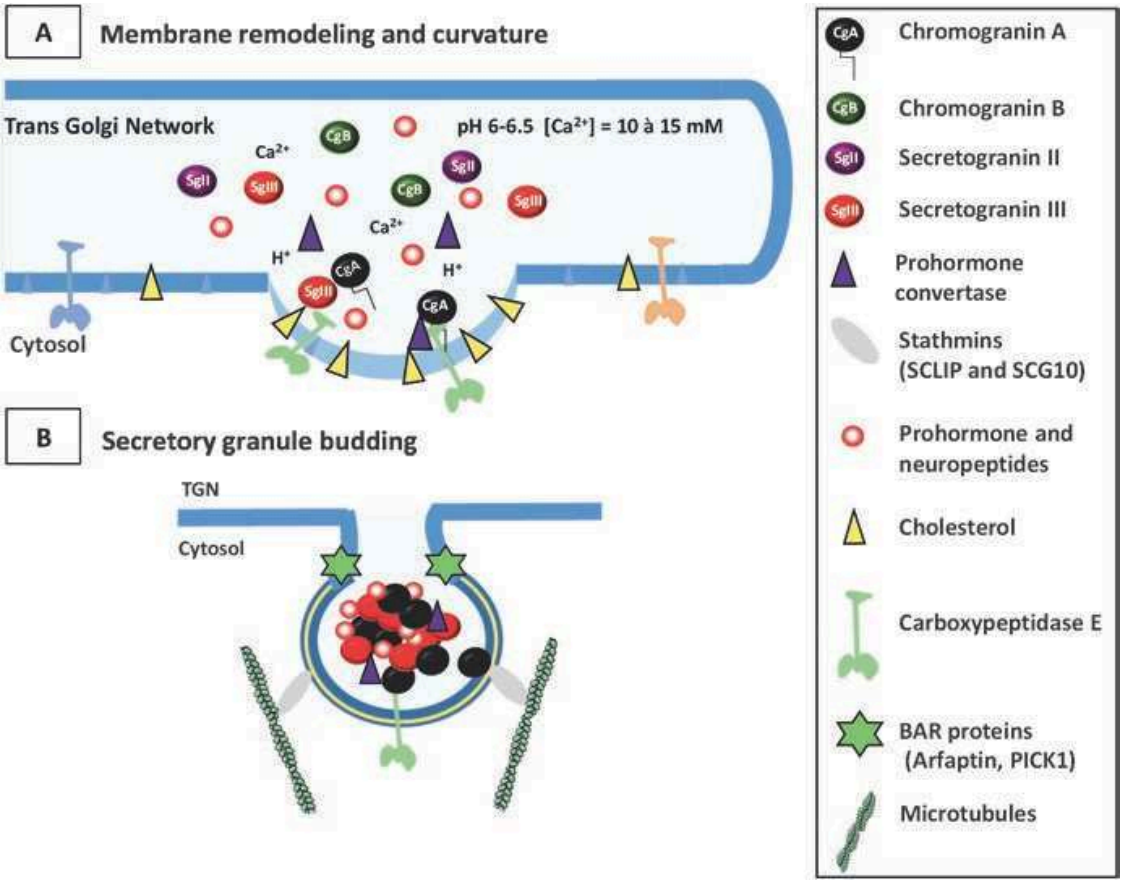


Fig. 1 Proposed model of chromogranin involvement in secretory granule biogenesis from TGN compartment. (**a**) Chromogranins induce the remodeling of the TGN membrane by interacting with distinct components: SgIII interacts with CgA, cholesterol and carboxypeptidase E. CgA also interacts with CPE. (**b**) At the cytosolic side of the TGN membrane, BAR proteins and stathmins are recruited to facilitate respectively the fission and the transfer to microtubules of nascent CgA-containing secretory granules for their transport towards the cell periphery

Their primary sequence exhibiting several dibasic sites, chromogranins are the substrates for intragranular prohormone-converting enzymes. Prohormone convertases are associated with cholesterol-rich lipid microdomains through α helices-rich hydrophobic domain(s) identified in their C-terminal part, thus acting as receptors that carry chromogranin-induced hormone aggregates to secretory granules (Dikeakos and Reudelhuber 2007).

Surprisingly, using a transcriptome/proteome-wide approach and co-immunoprecipitation experiments, SCLIP and SCG10 stathmins, cytosolic proteins known as regulators of microtubule polymerization, were identified as partners of CgA (Mahapatra et al. 2008). In this study, SCLIP and SCG10 were colocalized to the Golgi apparatus of chromaffin cells and their down-regulation altered chromaffin cell granules and abolished the level of secretion of endogenous CgA, SgII and CgB. Other cytosolic proteins are capable of sensing, inducing, and/or stabilizing membrane curvature through Bin/Amphiphysin/Rvs (BAR) domains which are crescent-shaped, dimeric α-helical modules and could thus participate to secretory granule formation (Frost et al. 2009, Rao and Haucke 2011). Recently, two members of this family, arfaptin 1 and PICK1, were related to the biogenesis of CgA-containing secretory granules through their binding to TGN membrane lipids (Fig. 1b) (Gehart et al. 2012, Cruz-Garcia et al. 2013, Holst et al. 2013, Pinheiro et al. 2014). Altogether, these data suggest that chromogranins influence the molecular organization of the TGN membrane to induce the recruitment of membrane and cytosolic proteins necessary for the budding of functional secretory granules, but the mechanism of action and the chronology of induced molecular events remain to be elucidated.

5 IV/ Are Chromogranins Linked to Hypersecretory Endocrine Pathologies?

Ubiquitous distribution of chromogranins in endocrine and neuroendocrine tissue from which they are secreted into the bloodstream, makes chromogranins useful markers of normal and tumoral neuroendocrine cells. In fact, multiple studies have documented the clinical value of detecting chromogranins and their derived peptides in tissues and measuring their circulating levels (Taupenot et al. 2003, Bartolomucci et al. 2011). Measurement of plasma chromogranins and derived peptide levels can be used to diagnose or monitor the progression of neuroendocrine tumors, the highest accuracy being observed in tumors characterized by an intense secretory activity (Guérin et al. 2010, Guillemot et al. 2006, 2014). This is the case of pheochromocytomas which are catecholamine-producing neoplasms arising from chromaffin cells of the adrenal medulla, leading to several clinical manifestations due to the actions of excess catecholamines, such as essential hypertension. Interestingly, the SgII-derived peptide EM66 has been established as a valuable

marker to distinguish benign and malignant pheochromocytomas (Yon et al. 2003, Guillemot et al. 2006). Serum CgA has been also well documented as a marker for sympathoadrenal activity underlying cardiovascular regulation and essential hypertension (O'Connor and Bernstein 1984; Takiyyuddin et al. 1994) along with catecholamines, as well as severe inflammatory diseases such as sepsis and systemic inflammatory response syndrome (Zhang et al. 2008). Moreover, it has been shown that CgA genetic variants may cause profound changes in human autonomic activity, and may associate with the risk of developing hypertension (Rao et al. 2007, Chen et al. 2008), suggesting a link between CgA expression, catecholamine secretion and blood pressure regulation.

Furthermore, Colombo et al. (2002) have shown that CgA expression in neoplastic cells affects tumor growth and morphogenesis in mouse models, suggesting that abnormal secretion of CgA by neuroendocrine neoplastic cells could affect tumorigenic processes. A very interesting study based on the comparison of normotensive and hypertensive patients with pheochromocytoma revealed lower urinary catecholamines and a global decreased chromaffin gene expression, including SgII, in tumors from normotensive patients (Haissaguerre et al. 2013). In line with a potential link between SgII, hormone secretion and tumorigenesis, we have recently demonstrated that SgII is expressed in prostate cancer, that its increased levels correlate with high grade tumors and that its expression triggers a neuroendocrine differentiation of prostatic tumor cells as revealed by the appearance of secretory granules and a secretory activity. Because neuroendocrine differentiation is associated with a poor prognosis, these data suggest that SgII-induced secretion may play a pivotal role in prostate cancer progression (Courel et al. 2014).

Chromogranins seem to be also implicated in the alteration of hormone secretion observed in the context of metabolic disorders. Indeed, CgA knockout mice display increased adiposity and high levels of circulating leptin and catecholamines. As in diet-induced obese mice, desensitization of leptin receptors caused by hyperleptinemia is believed to contribute to the obese phenotype of these KO mice (Bandyopadhyay et al. 2012). In small bowel Crohn's disease, glucagon-like peptide 1 and CgA-immunopositive cells were significantly increased with appreciable mRNA increases for CgA, glucagon-like peptide 1 and Neurogenin 3, an enteroendocrine transcription factor, indicating an enhanced enteroendocrine cell activity (Moran et al. 2012). In accordance, modifications of CgA-immunoreactive cell density were also observed in the small intestine epithelium of patients with irritable bowel syndrome (IBS) after receiving dietary guidance, which may reflect a change in the densities of the small intestinal enteroendocrine cells, suggesting the contribution of their secretory activity to the improvement in the IBS symptoms (Mazzawi and El-Salhy 2016). Furthermore, the knockout of the CgB gene in mice provoked a reduction in stimulated secretion of insulin, glucagon and somatostatin in pancreatic islets, and consequently CgB-KO animals display some hallmarks of human type-2 diabetes (Obermüller et al. 2010).

6 Concluding Remarks

While aggregation ability of chromogranins allows the segregation of secretory granule cargo proteins, the anchor of the chromogranin-bound cargo proteins to the TGN membrane as the secretory granule forms or matures seems to result from a less universal mechanism. The study of chromogranin-expressing cells, which possess multiple types of secretory granules and thus the ability to selectively secrete different cocktails of biologically active components (Dannies 2001), may be informative on the variety of existing chromogranin-mediated sorting mechanisms. The identification of the membrane patches into the TGN recognized by the protein cargo, and the understanding of their interactions with cytosolic proteins would help to describe the transport, docking at the membrane, and exocytosis of secretory granules. What is already known is that chromogranins and their conserved domains are not only important for promoting the biogenesis of secretory granules, but also for the targeting and release of hormones through the regulated secretory pathway (Gondré-Lewis et al. 2012). These findings raise the interesting possibility that chromogranins could be relevant factors in the formation of secretory granules, probably by promoting the interactions between the secretory granule membrane and cytosolic proteins. Because several studies performed on neuroendocrine cells have provided clues regarding the redundant and non-redundant roles of chromogranins and chromogranin-derived peptides in the regulated secretory pathway, non-endocrine cell models or endocrine cell models devoid of a regulated secretory pathway expressing chromogranins could constitute useful and appropriate tools to further characterize the molecular mechanisms by which each chromogranin contributes to or establishes a regulated secretory pathway. The increasing evidence showing that chromogranins are crucial actors impacted in many diseases related to endocrine disruption indicates that chromogranins should be considered more than disease markers and warrants further studies to unravel their molecular mechanism of action and thereby to identify novel therapeutical strategies for the treatment of various pathologies including neuroendocrine tumors, essential hypertension and/or metabolic disorders which are increasingly affecting the populations.

References

Bandyopadhyay GK, Vu CU, Gentile S, Lee H, Biswas N, Chi N-W, O'Connor DT, Mahata SK (2012) Catestatin (chromogranin A(352-372)) and novel effects on mobilization of fat from adipose tissue through regulation of adrenergic and leptin signaling. J Biol Chem 287:23141–23151

Bartolomucci A, Possenti R, Mahata SK, Fischer-Colbrie R, Loh YP, Salton SRJ (2011) The extended granin family: structure, function, and biomedical implications. Endocr Rev 32:755–797

Cawley NX, Rathod T, Young S, Lou H, Birch N, Loh YP (2016) Carboxypeptidase E and secretogranin III coordinately facilitate efficient sorting of proopiomelanocortin to the regulated secretory pathway in AtT20 cells. Mol Endocrinol 30:37–47

Chanat E, Huttner WB (1991) Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the trans-Golgi network. J Cell Biol 115:1505–1519

Chen Y, Rao F, Rodriguez-Flores JL et al (2008) Naturally occurring human genetic variation in the 3′-untranslated region of the secretory protein chromogranin A is associated with autonomic blood pressure regulation and hypertension in a sex-dependent fashion. J Am Coll Cardiol 52:1468–1481

Colombo B, Curnis F, Foglieni C, Monno A, Arrigoni G, Corti A (2002) Chromogranin A expression in neoplastic cells affects tumor growth and morphogenesis in mouse models. Cancer Res 62:941–946

Courel M, Soler-Jover A, Rodriguez-Flores JL, Mahata SK, Elias S, Montero-Hadjadje M, Anouar Y, Giuly RJ, O'Connor DT, Taupenot L (2010) Pro-hormone secretogranin II regulates dense core secretory granule biogenesis in catecholaminergic cells. J Biol Chem 285:10030–10043

Courel M, El Yamani F-Z, Alexandre D et al (2014) Secretogranin II is overexpressed in advanced prostate cancer and promotes the neuroendocrine differentiation of prostate cancer cells. Eur J Cancer 50:3039–3049

Cowley DJ, Moore YR, Darling DS, Joyce PB, Gorr SU (2000) N- and C-terminal domains direct cell type-specific sorting of chromogranin A to secretory granules. J Biol Chem 275:7743–7748

Cruz-Garcia D, Ortega-Bellido M, Scarpa M, Villeneuve J, Jovic M, Porzner M, Balla T, Seufferlein T, Malhotra V (2013) Recruitment of arfaptins to the trans-Golgi network by PI(4)P and their involvement in cargo export. EMBO J 32:1717–1729

Dannies PS (2001) Concentrating hormones into secretory granules: layers of control. Mol Cell Endocrinol 177:87–93

Díaz-Vera J, Morales YG, Hernández-Fernaud JR, Camacho M, Montesinos MS, Calegari F, Huttner WB, Borges R, Machado JD (2010) Chromogranin B gene ablation reduces the catecholamine cargo and decelerates exocytosis in chromaffin secretory vesicles. J Neurosci 30:950–957

Dikeakos JD, Reudelhuber TL (2007) Sending proteins to dense core secretory granules: still a lot to sort out: Figure 1. J Cell Biol 177(2):191–196

Elias S, Delestre C, Ory S, Marais S, Courel M, Vazquez-Martinez R, Bernard S, Coquet L, Malagon MM, Driouich A, Chan P, Gasman S, Anouar Y, Montero-Hadjadje M (2012) Chromogranin A Induces the Biogenesis of Granules with Calcium- and Actin-Dependent Dynamics and Exocytosis in Constitutively Secreting Cells. Endocrinol 153(9):4444–4456

Fargali S, Garcia AL, Sadahiro M et al (2014) The granin VGF promotes genesis of secretory vesicles, and regulates circulating catecholamine levels and blood pressure. FASEB J 28:2120–2133

Frost A, Unger VM, De Camilli P (2009) The BAR domain superfamily: membrane-molding macromolecules. Cell 137:191–196

Gehart H, Goginashvili A, Beck R, Morvan J, Erbs E, Formentini I, De Matteis MA, Schwab Y, Wieland FT, Ricci R (2012) The BAR domain protein Arfaptin-1 controls secretory granule biogenesis at the trans-Golgi network. Dev Cell 23:756–768

Gondré-Lewis MC, Park JJ, Loh YP (2012) Cellular mechanisms for the biogenesis and transport of synaptic and dense-core vesicles. Int Rev Cell Mol Biol 299:27–115

Guérin M, Guillemot J, Thouënnon E et al (2010) Granins and their derived peptides in normal and tumoral chromaffin tissue: implications for the diagnosis and prognosis of pheochromocytoma. Regul Pept 165:21–29

Guillemot J, Anouar Y, Montero-Hadjadje M et al (2006) Circulating EM66 is a highly sensitive marker for the diagnosis and follow-up of pheochromocytoma. Int J Cancer 118:2003–2012

Guillemot J, Guérin M, Thouënnon E, Montéro-Hadjadje M, Leprince J, Lefebvre H, Klein M, Muresan M, Anouar Y, Yon L (2014) Characterization and plasma measurement of the WE-14 peptide in patients with pheochromocytoma. PLoS One 9:e88698

Haissaguerre M, Courel M, Caron P et al (2013) Normotensive incidentally discovered pheochromocytomas display specific biochemical, cellular, and molecular characteristics. J Clin Endocrinol Metab 98:4346–4354

Hendy GN, Li T, Girard M, Feldstein RC, Mulay S, Desjardins R, Day R, Karaplis AC, Tremblay ML, Canaff L (2006) Targeted ablation of the chromogranin a (Chga) gene: normal neuroendocrine dense-core secretory granules and increased expression of other granins. Mol Endocrinol 20:1935–1947

Holst B, Madsen KL, Jansen AM et al (2013) PICK1 deficiency impairs secretory vesicle biogenesis and leads to growth retardation and decreased glucose tolerance. PLoS Biol 11:e1001542

Hosaka M, Watanabe T, Sakai Y, Uchiyama Y, Takeuchi T (2002) Identification of a chromogranin A domain that mediates binding to secretogranin III and targeting to secretory granules in pituitary cells and pancreatic beta-cells. Mol Biol Cell 13:3388–3399

Hosaka M, Suda M, Sakai Y, Izumi T, Watanabe T, Takeuchi T (2004) Secretogranin III binds to cholesterol in the secretory granule membrane as an adapter for chromogranin A. J Biol Chem 279:3627–3634

Hosaka M, Watanabe T, Sakai Y, Kato T, Takeuchi T (2005) Interaction between secretogranin III and carboxypeptidase E facilitates prohormone sorting within secretory granules. J Cell Sci 118:4785–4795

Kim T, Tao-Cheng JH, Eiden LE, Loh YP (2001) Chromogranin A, an "on/off" switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. Cell 106:499–509

Kim T, Gondré-Lewis MC, Arnaoutova I, Loh YP (2006) Dense-core secretory granule biogenesis. Physiology (Bethesda) 21:124–133

Kingsley DM, Rinchik EM, Russell LB, Ottiger HP, Sutcliffe JG, Copeland NG, Jenkins NA (1990) Genetic ablation of a mouse gene expressed specifically in brain. EMBO J 9:395–399

Machado JD, Díaz-Vera J, Domínguez N, Alvarez CM, Pardo MR, Borges R (2010) Chromogranins A and B as regulators of vesicle cargo and exocytosis. Cell Mol Neurobiol 30:1181–1187

Mahapatra NR, O'Connor DT, Vaingankar SM et al (2005) Hypertension from targeted ablation of chromogranin A can be rescued by the human ortholog. J Clin Invest 115:1942–1952

Mahapatra NR, Taupenot L, Courel M, Mahata SK, O'Connor DT (2008) The trans-Golgi proteins SCLIP and SCG10 interact with chromogranin A to regulate neuroendocrine secretion. Biochemistry 47:7167–7178

Mazzawi T, El-Salhy M (2016) Changes in small intestinal chromogranin A-immunoreactive cell densities in patients with irritable bowel syndrome after receiving dietary guidance. Int J Mol Med 37:1247–1253

Metz-Boutigue MH, Garcia-Sablone P, Hogue-Angeletti R, Aunis D (1993) Intracellular and extracellular processing of chromogranin A. Determination of cleavage sites. Eur J Biochem 217:247–257

Montero-Hadjadje M, Vaingankar S, Elias S, Tostivint H, Mahata SK, Anouar Y (2008) Chromogranins A and B and secretogranin II: evolutionary and functional aspects. Acta Physiol (Oxf) 192:309–324

Moran GW, Pennock J, McLaughlin JT (2012) Enteroendocrine cells in terminal ileal Crohn's disease. J Crohns Colitis 6:871–880

Mosley CA, Taupenot L, Biswas N et al (2007) Biogenesis of the secretory granule: chromogranin A coiled-coil structure results in unusual physical properties and suggests a mechanism for granule core condensation. Biochemistry 46:10999–11012

O'Connor DT, Bernstein KN (1984) Radioimmunoassay of chromogranin A in plasma as a measure of exocytotic sympathoadrenal activity in normal subjects and patients with pheochromocytoma. N Engl J Med 311:764–770

Obermüller S, Calegari F, King A et al (2010) Defective secretion of islet hormones in chromogranin-B deficient mice. PLoS One 5:e8936

Pinheiro PS, Jansen AM, de Wit H, Tawfik B, Madsen KL, Verhage M, Gether U, Sørensen JB (2014) The BAR domain protein PICK1 controls vesicle number and size in adrenal chromaffin cells. J Neurosci 34:10688–10700

Rao Y, Haucke V (2011) Membrane shaping by the Bin/amphiphysin/Rvs (BAR) domain protein superfamily. Cell Mol Life Sci 68:3983–3993

Rao F, Wen G, Gayen JR et al (2007) Catecholamine release-inhibitory peptide catestatin (chromogranin A(352-372)): naturally occurring amino acid variant Gly364Ser causes profound changes in human autonomic activity and alters risk for hypertension. Circulation 115:2271–2281

Sun M, Watanabe T, Bochimoto H, Sakai Y, Torii S, Takeuchi T, Hosaka M (2013) Multiple sorting systems for secretory granules ensure the regulated secretion of peptide hormones. Traffic 14:205–218

Takiyyuddin MA, Brown MR, Dinh TQ, Cervenka JH, Braun SD, Parmer RJ, Kennedy B, O'Connor DT (1994) Sympatho-adrenal secretion in humans: factors governing catecholamine and storage vesicle peptide co-release. J Auton Pharmacol 14:187–200

Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT (2003) The chromogranin-secretogranin family. N Engl J Med 348:1134–1149

Thiele C, Huttner WB (1998) The disulfide-bonded loop of chromogranins, which is essential for sorting to secretory granules, mediates homodimerization. J Biol Chem 273:1223–1231

Yon L, Guillemot J, Montero-Hadjadje M, Grumolato L, Leprince J, Lefebvre H, Contesse V, Plouin P-F, Vaudry H, Anouar Y (2003) Identification of the secretogranin II-derived peptide EM66 in pheochromocytomas as a potential marker for discriminating benign versus malignant tumors. J Clin Endocrinol Metab 88:2579–2585

Yoo SH, Lewis MS (1993) Dimerization and tetramerization properties of the C-terminal region of chromogranin A: a thermodynamic analysis. Biochemistry 32:8816–8822

Zhang D, Lavaux T, Voegeli AC, Lavigne T, Castelain V, Meyer N, Sapin R, Aunis D, Metz-Boutigue MH, Schneider F (2008) Prognostic value of chromogranin A at admission in critically ill patients: a cohort study in a medical intensive care unit. Clin Chem 54:1497–1503